

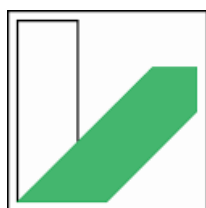
Synthese von 3-Acyltetramsäurederivaten und deren Markierung zur Visualisierung in Zellen

Dissertationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades eines *Doctor rerum naturalium*
an der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der
Universität Bayreuth

vorgelegt von:
Karl Kempf

2017



**UNIVERSITÄT
BAYREUTH**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von *November 2008* bis *Dezember 2016* in Bayreuth am Lehrstuhl OC I unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Rainer Schobert angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 9. 1. 2017

Zulassung durch die Promotionskommission: 11. 1. 2017

Wissenschaftliches Kolloquium: 4. 5. 2017

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Stefan Schuster

Prüfungsausschuß:

Prof. Dr. Rainer Schobert	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Carlo Unverzagt	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Mukundan Thelakkat	(Vorsitz)
Prof. Dr. Rhett Kempe	

Gewidmet meiner lieben Frau Oxana, die alles für mich bedeutet

“Die höchste Form des Glücks ist ein Leben mit einem gewissen Grad an Verrücktheit”

Erasmus von Rotterdam

„Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.“

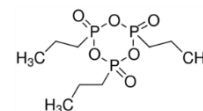
„Probleme kann man niemals mit derselben Denkweise lösen, durch die sie entstanden sind.“

Albert Einstein

Abkürzungen

Äq	Äquivalent
ATR	attenuated total reflectance
br	breites Signal
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyl-oxy-carbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -Butyl-dicarbonat
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
C ^q	quartäres C-Atom
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dd	dupliziertes Dublett
DMAP	N,N-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfat
dq	dupliziertes Quartett
EDC*HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid- Hydrochlorid
EI	Elektronenionisation
Et	Ethyl
EtOAc, EE	Essigsäureethylester
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
Fmoc	Fluorenyl-methoxy-carbonyl
GC	Gaschromatografie
h	Stunde
HOMO	(energetisch) höchstes besetztes Molekülorbital
HONSu	N-Hydroxysuccinimid
HV	Hochvakuum
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion
Hz	Hertz
IMDA	intramolekulare Diels- Alder- Reaktion
IPCC	Isopropenylchlorocarbonat
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante

LiHMDS	Lithium-bis-(trimethylsilyl) amid; Lithiumhexamethyldisilazid
Lit.	Literatur
LUMO	(energetisch) niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
m	Multipllett
min	Minute
mL	Milliliter
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie
NEt ₃	Triethylamin
NMR	nuclear magnetic resonance
Nosyl	2-Nitro-benzol-sulfonyl
PCC	Pyridinium- Chlorochromat
Ph	Phenyl
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl
PNB	<i>para</i> -Nitrobenzyl
ppm	parts per million
PPTS	Pyridinium-p-toluolsulfonat
q	Quartett
qn	Quintett
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
T	Temperatur
t	Triplett
<i>t</i>	tertiär
T ₃ P	2,4,6-Tripropyl-1,3,5,2,4,6-trioxatriphosphorinane-2,4,6-trioxide
TBS	<i>tert</i> Butyl-dimethyl-silyl
TMS(E)	Trimethyl-silyl(ethyl)
TCAI	Trichloracetimidat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyranyl
TIPS	Triisopropylsilyl
TosOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
UV	Ultraviolett



Inhaltsverzeichnis

1. Vorwort	10
2. Einleitung	11
2.1 Biosynthese von Tetramsäuren	11
2.2 Melophline.....	12
2.3 Penicillennole.....	13
2.3 Glycosyl- Tetramsäuren	14
2.4 Oligoenoyltetramsäuren	15
2.5 Decalinoyltetramsäuren	16
2.6 Makrocyclische Tetramsäuren	19
2.7 N-Acyl-Tetramsäuren.....	19
2.8 Alkaloid- Tetramsäuren	20
2.9 Tetramsäuren als Abbauprodukte von N-Acyl-Homoserinlactonen	21
2.10. Synthesemethoden für Tetramsäuren	22
2.10.1 Lacey-Dieckmann-Cyclisierung.....	22
2.10.2 Pyrolyse von C-Aminoacyl-Meldrum's Säure.....	23
2.10.3 Dominosynthese.....	24
2.11 Synthese von Oligoenoyltetramsäurederivaten	25
3. Vorstellung der Teilprojekte (Σύνοψη)	26
3.1 Markierung von 3-Acyltetramsäuren.....	27
3.1.1 Aufbau des Tetramsäuregrundkörpers von Melophlin C	30
3.1.2 Synthese von 3-Acyltetramsäuren mit Aminofunktionalisierter Seitenkette	33
3.1.3 Synthese verschiedener terminaler Alkine für Klick- Markierung	36
3.1.4 Synthese von Bisazidderivaten für Photoaffinitätsmarkierung und Isolierung der Zielproteine	44
3.2 3-Acylierung von Tetramsäuren mittels Ketenyliden-triphenylphosphoran und Umsetzung der Ylide mit verschiedenen Oxokomponenten.....	48
3.2.1 3-Acylierung von Tetramsäuren mittels Ketenyliden-triphenylphosphoran 43	51
3.2.2 Untersuchungen zur Wittig- Reaktion der Tetramsäure-3-Acyl-Ylide	53
3.2.3 Problematische Reinigung von 3- Acyltetramsäuren.....	58
3.2.4 Umsetzung der Tetramsäure-3-Acyl-Ylide mit verschiedenen Oxo-Komponenten	60

3.3 Synthese von natürlichen 3-Acyltetramsäuren	68
3.3.1 Synthese der geschützten Tetramsäure für Penicillenol C 12	68
3.3.2 Eliminierung als Schlüsselschritt zu Penicillenol B	72
3.3.3 Optimierung der Dominosynthese von Tetramaten mit Ph ₃ PCCO	76
3.3.4 Synthese der Seitenkette von Penicillenol C	86
3.3.5 Synthese von Decalinoyltetramsäuren.....	90
4. Darstellung des Eigenanteils der Publikationen	107
4.0 Vorstellung der Schobert- Methode („Schlempf- Reaktion“)	107
4.1 Tetramsäurederivate für Biotests.....	107
4.2 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Schutzgruppen für die β-Hydroxygruppe in Aminosäuren auf die Dominosynthese für Tetramate	108
4.3 Synthese von Penicillenol C1 mit Zuordnung des α- Stereozentrums und Markierung mit Bisazid	110
4.4 Synthese von Penicillenol B1 und B2	110
4.5 Synthese von Allo- Methiosetin und TA-289.....	111
4.5.1 Vorbemerkungen.....	111
4.5.2 Lösungsansätze für die Aufklärung der noch offenen Fragen	113
4.5.3 veröffentlichte Version	126
4.6 Liste der eigenen Veröffentlichungen	127
5. Experimentelle Daten	128
5.1 Alkine	128
(S)-5-sec-butyl-3-((E)-1-hydroxyhexadec-2-en-15-ynylidene)pyrrolidine-2,4-dione 117	128
3-((E)-1-hydroxyhexadec-2-en-15-ynylidene)-1,5-dimethylpyrrolidine-2,4-dione 119	130
14-(trimethylsilyl)tetradec-13-yn-1-ol 107c ⁴⁵	132
(E)-S-tert-butyl 18-(trimethylsilyl)-3-oxooctadec-4-en-17-ynethioate 112	134
(E)-N-Methyl,N-methoxycarbonylmethyl-18-(trimethylsilyl)-3-oxooctadec-4-en-17-ynеоic-acid-amide 113	138
3-((E)-1-hydroxyhexadec-2-en-15-ynylidene)-1-methylpyrrolidine-2,4-dione 115	140
(S)-5-((R)-1-hydroxyethyl)-3-((E)-1-hydroxyhexadec-2-en-15-ynylidene)-1-methylpyrrolidine-2,4-dione 120c	142
(S)-5-((R)-1-hydroxyethyl)-3-((E)-1-hydroxynona-2-en-8-ynylidene)-1-methylpyrrolidine-2,4-dione 120a ..	144
hept-6-ynal 104a	146
(S)-5-((R)-1-hydroxyethyl)-3-(1-hydroxytetradec-13-ynylidene)-1-methylpyrrolidine-2,4-dione 121	148

4-hydroxy-5-methyl-3-(tetradec-13-ynoyl)thiophen-2(5H)-one 123	150
(S)-5-benzyl-3-((E)-1-hydroxyhexadec-2-en-15-ynylidene)pyrrolidine-2,4-dione 118	152
5.2 Bisazide.....	153
3-(1'-Hydroxy-11'-(3-azido-5-(azidomethyl)benzamido)undecan-1'-ylidene)-5-methyl-1-methylpyrrolidine-2,4-dione 129	153
3-(1'-Hydroxy-11'-(3-azido-5-(azidomethyl)benzamido)undecan-1'-ylidene)-5-phenylmethyl-1-methylpyrrolidine-2,4-dione 130	155
5.3 Aminoester und nicht markierte Penicillenolderivate	156
L-Threonin-methylester-hydrochlorid 173	156
(4S,5R)-Methyl-5-methyloxazolidin-4-carboxylat 175 ⁵⁷	157
N-Methyl- O-TBDMS -L-threonin-methylester 250	157
N-Methyl- O-TBDPS -L-threonin-benzylester 258	159
(S)-5-((R) 1-(tertbutyl-diphenyl-silyl)oxy-ethyl)-4-benzoyloxy-1-methyl-1H-pyrrol-2(5H)-on 263	161
(S)-5-((R) 1-(tertbutyl-diphenyl-silyl)oxy-ethyl)- 1-methyl-pyrrolidin-2,4-dion 259	163
(5S)-((1R)- TBDPS-oxyethyl)-1-methyl-3-((2E,8E,10E)-dodecatrienoyl)-pyrrolidin-2,4-dion 260	164
(5S)-((1R)- hydroxyethyl)-1-methyl-3-((2E,8E)- decadienoyl)-pyrrolidin-2,4-dion 264	165
(5S)-((1R)- hydroxyethyl)-1-methyl-3-((2E)- dodecenoyl)-pyrrolidin-2,4-dion 265	167
Hydro- Penicillenol B 266	167
5.4 Octalinoyltetramsäuren.....	169
TBDPS- Allomethioisetin 267	169
Phenyl- TA289 268	171
(5R/S)-Methyl-3-((4aR,8aR)-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-2,5,5,8a-tetramethylnaphthalin-1-carbonyl)pyrrolidin-2,4-dion 269	173
6. Ausblick.....	175
7. Zusammenfassung.....	189
7.1 auf Deutsch	189
7.2 Summary in English	192
8. Dankerbietung.....	195
9. Literaturverzeichnis	197

1. Vorwort

Schon vor zehntausenden von Jahren versuchten Menschen mit bestimmten Pflanzen Schmerzen zu lindern und Krankheiten zu bekämpfen. Später wurden zu diesem Zweck gezielt Pflanzen- und Tierextrakte hergestellt. Vor über 200 Jahren begannen die frühen organischen Chemiker, einzelne Stoffe aus solchen Extrakten zu isolieren und durch Abbaureaktionen zu charakterisieren. Erst Wöhler bewies 1828 mit seiner Darstellung von organischem Harnstoff aus anorganischem Ammoniumcyanat, dass Naturstoffe auch *in vitro* synthetisiert werden können.

Heute beschäftigen sich viele Wissenschaftler mit der großangelegten, oft automatisierten Extraktion und systematischen Sichtung von Organismen, um neue Wirkstoffe zu finden. Dabei bieten sessile Organismen wie Pflanzen, Pilze, Schwämme, Korallen etc. besonders großes Potential, da Synthese von chemischen Verbindungen ihre einzige Möglichkeit darstellt, sich gegen Prädatoren zu wehren und gegen ökologische Konkurrenz zu behaupten.

Solche natürlichen Wirkstoffe sind allerdings fast ausschließlich Sekundärmetabolite und damit nur in geringen Mengen in ihren Produzenten vorhanden. Deshalb benötigt man große Mengen an lebendem Material, um Kleinstmengen eines Naturstoffes zu isolieren. Viele Organismen lassen sich aber bisher noch nicht im Labor kultivieren, sondern können nur in ihrem natürlichen Lebensraum zusammen mit dem Konsortium von Symbionten oder Kommensalen existieren. Diese Beschränkung in der Zugänglichkeit eines Naturstoffes rechtfertigt oft alleine schon seine chemische Totalsynthese. Zusätzlich erlaubt die etablierte Synthese einer Verbindung Variationen an der Peripherie des Pharmakophors, die seine biologische Wirkung in ersten Zelltests erheblich steigern können. Dabei kann eine verbesserte Kenntnis der Struktur-Wirkungsbeziehung auch den Angriffspunkt der Verbindung in der Zelle und damit den Aktionsmechanismus näher bestimmen. Eine weitere Hürde in der Entwicklung neuer Arzneistoffe ist die Applikation bei vielzelligen Organismen und schließlich auch bei Säugetieren, die oft eine Änderung der Pharmakokinetik und infolgedessen eine Modifikation in der chemischen Struktur erfordert. Das heißt, in dieser Phase der Entwicklung werden Nebenwirkungen reduziert, die Verteilung im Organismus und im Zielgewebe verbessert, die Membrangängigkeit erhöht, Affinitäten zu Effluxpumpen verringert, eventuell eine orale Applikation ermöglicht, die Halbwertszeit der Wirksamkeit verlängert und so weiter.

Aus den genannten Gründen wird parallel zur Suche neuer Naturstoffe, die möglichst viele der oben skizzierten Eigenschaften *per se* besitzen, auch an der Synthese von Derivaten bereits bekannter Verbindungen gearbeitet, die Ähnlichkeiten zur Leitstruktur gut untersuchter bioaktiver Wirkstoffe enthalten.

2. Einleitung

Eine Leitstruktur vielfältig bioaktiver Naturstoffe findet man in Tetramsäure **2**, ein Trivialname für Pyrrolidin-2,4-dion. Wie bei Heterozyklen üblich, wird mit der Nummerierung am Heteroatom begonnen. Ebenfalls große Bedeutung haben Derivate der Sauerstoff-bzw. Schwefel-Analoga Tetronsäure **1** und Thiotetronsäure **3** (Abb.1). Wichtig ist außerdem, dass Tetronsäuren stärker acide sind als Tetramsäuren und dass sie in Lösung bevorzugt in der 4-Hydroxy-Butenolidform im Gegensatz zu der bei Tetramsäuren vorherrschenden 2,4-Diketoform vorliegen¹. Allerdings verschieben unter anderem N-Acylsubstituenten und polarere Solventien auch bei Tetramsäuren das Gleichgewicht in Richtung der Enolform².

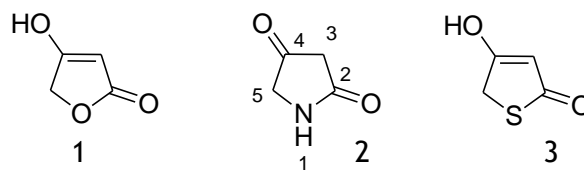


Abb. 1: Tetronsäure **1**, Tetramsäure **2**, Thiotetronsäure **3**

2.1 Biosynthese von Tetramsäuren

Die Stoffklasse der Tetramsäurederivate ist besonders reich an natürlichen Vertretern, verglichen mit den Sauerstoff- und Schwefel-Analoga, da sie biosynthetisch¹ (Abb.2) auf den ubiquitär im Primärstoffwechsel vorhandenen Aminosäuren basieren. Genau wie bei den Tetronsäuren, sind auch die 3-Acyl-Tetramsäuren die häufigsten und biologisch aktivsten Vertreter. Dies liegt an den größeren strukturellen Variationsmöglichkeiten, am vergrößerten π -System, an der Ähnlichkeit zu Phosphationen, wodurch manche Tetronsäuren an Kinasen oder Phosphatasen binden können und an der Fähigkeit, Metalle zu chelatisieren. Da die Kohlenstoffatome **2** und **3** aus dem Biosyntheseweg für Polyketide („Polyketidschiene“) stammen, liegt ein Substituent am C3 von vorneherein schon als Acylrest vor.

Dies ist näher in Abbildung 2 dargestellt. Die Polyketidsynthese reduziert, im Gegensatz zur Fettsäuresynthase, die Acetyl- Coenzym A- Grundbausteine **4** nur bis zu Oligo-(β -Keto)-Einheiten **5**, welche dann am Multienzymkomplex der nichtribosomalen Peptidsynthetase mit einer Aminosäure **6** zum β -Ketoamid **7** verknüpft werden. **7** zyklisiert dann in einer weiteren Untereinheit der nichtribosomalen Peptidsynthetase oder auch spontan im Cytosol zur 3-Acyl-tetramsäure **8**. Die Aktivierung der Carbonsäuren erfolgt bei allen diesen

Schritten, wie in der Biosynthese üblich, als Thioester. Die dafür nötige Mercaptogruppe stammt von einem Cystein eines beteiligten Enzyms oder von einem Coenzym.

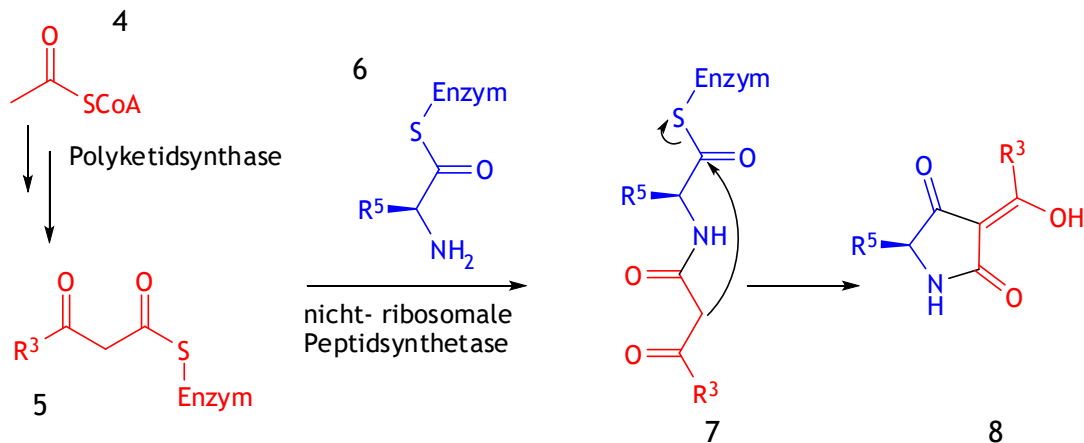


Abb.2: Biosynthese von 3-Acyl-tetramsäurederivaten 8

2.2 Melophline

Ein Beispiel für einfache 3-Acyl-N-methyltetramsäuren sind die 19 aus verschiedenen Populationen des marinen Schwammes *Melophlus sarasinorum* (Abb.3) isolierten Melophline (Abb. 4a)³. Sie unterscheiden sich nur durch die Methylgruppe⁷⁹ in 5-Position, in der Stellung der höchstens einmal im Molekül vorhandenen Methylverzweigung in der gesättigten Seitenkette und in deren Länge. Das Stereozentrum am C-5 ist bestimmt durch die Herkunft von den drei möglichen Aminosäuren Sarcosin, D,L-Alanin und L-Alanin. Das Stereozentrum an der Methylverzweigung der Seitenkette liegt meist racemisch vor. Die Melophline zeigten sowohl antibiotische als auch cytotoxische Aktivität in diversen Untersuchungen⁴.



Abb.3: *Melophlus sarasinorum*⁵

Aufgrund ihrer vielfältigen Bioaktivität sind die Melophline noch immer Gegenstand zellbiologischer Untersuchungen. Interessant ist, dass auch aus dem endophytischen Pilz *Penicillium* sp. GQ-7 strukturell eng verwandte 3-Acyl-N-methyltetramsäurederivate (Penicillenole, Abb.4b) isoliert wurden⁶.

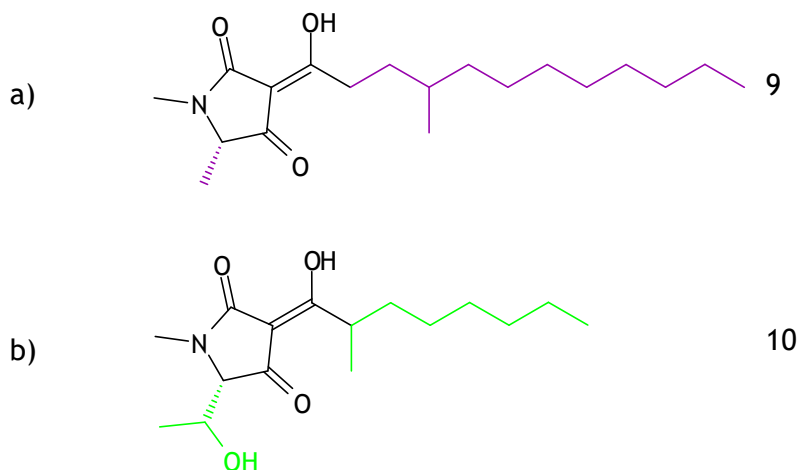


Abb.4: Strukturen von a) Melophlin B 9

b) Penicillenol A₁ 10

2.3 Penicillenole

Erst 2008 veröffentlichte eine Forschergruppe von der Ozean-Universität in Qingdao/ China die Struktur von neuen 3-Acyl-tetramsäurederivaten⁶. Bisher wurden sechs verschiedene Penicillenole aus dem Ethylacetat⁷⁸-Extrakt des *Penicillium* sp. GQ-7-Kulturmediums nach Trennung mittels HPLC isoliert.

Penicillium sp. GQ-7 ist vergesellschaftet mit der Flussmangrove *Aegiceras corniculatum* (Abb.4).



Abb.5⁷: *Aegiceras corniculatum*⁸

Abb.6 zeigt die Penicillenole A₁ 10, B₁ 11, C₁ 12. Die anderen isolierten Verbindungen A₂ und C₂ unterscheiden sich nur durch die Konfiguration am Stereozentrum C5 beziehungsweise durch die E-Substitution der Doppelbindung bei B₂. Die α-Methylgruppe steht jeweils in S-Konfiguration.

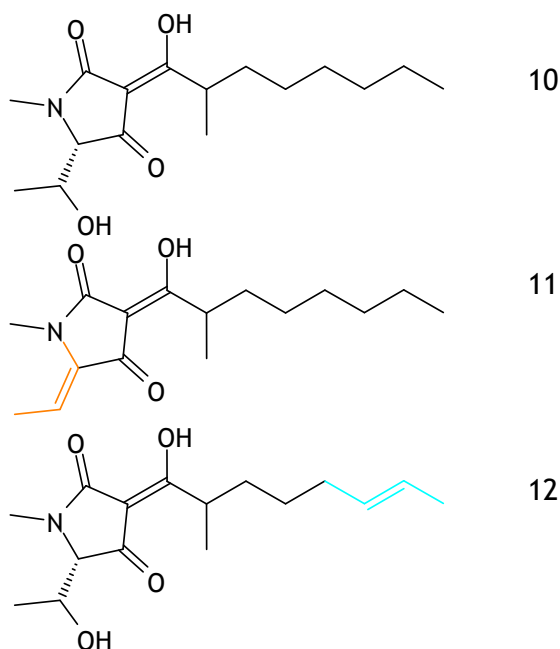


Abb.6: Penicillenol A₁ **10**, B₁ **11** und C₁ **12**

Eine Enoleinheit in der Struktur wurde vermutet, weil sich die Flecken auf dem DC mit FeCl₃ rot färbten. Tatsächlich stellen 3-Acyl-tetramsäuren starke Chelatliganden dar. Die Penicillenole A₁ und B₁ zeigten Cytotoxizität gegen die humanen Krebszellen der Linie HL-60 mit IC₅₀-Werten von 0,76 µM bzw. 3,20 µM⁶.

Um mehr Material für ausführliche Tests zu erhalten und um durch gezielte Variationen Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzustellen, ist es notwendig, eine Totalsynthese zu etablieren. Dies ist Gegenstand des dritten Aufgabenblockes der vorliegenden Arbeit.

2.3 Glycosyl- Tetramsäuren

Ein Beispiel für glycosylierte Vertreter ist Epicoccamid **13**, welches große strukturelle Ähnlichkeiten zu den Melophlinen aufweist, nämlich die Methylgruppen in Position 1 und 5 (Abb.7). Die Acylseitenkette trägt eine α-Methylgruppe und ist an der ω-Hydroxygruppe β-glycosidisch mit D-Mannose kondensiert. **13** wurde 2003 aus dem marinen Pilz *Epicoccum purpurascens* isoliert⁹, welcher in der Qualle *Aurelia aurita* lebt. 2015 konnte mit Epicoccamid **13** erstmals ein Naturstoff dieser Klasse von meinem Laborkollegen Sebastian Loscher synthetisiert werden¹⁰.

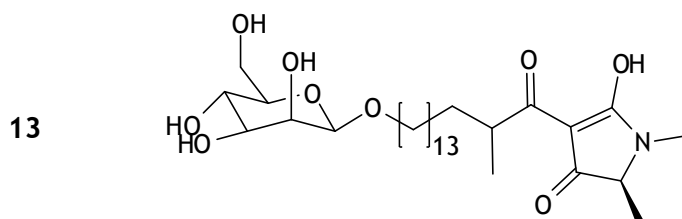


Abb.7: Struktur von Epicoccamid **13**

2.4 Oligoenoyltetransäuren

Wie bereits erwähnt, basiert die Seitenkette der Tetransäuren biosynthetisch auf der Polyketidschiene, die primär 1,3-Polycarbonyleinheiten liefert. Reduktion zu den Alkoholen und Eliminierung führt zu Oligoenoyltetransäuren. Ein Beispiel ist Tirandalydigin **14** (Abb.8), isoliert aus *Streptomyces tirandis* ssp¹¹. **14** inhibiert die DNS-abhängige RNS-Polymerase¹² und wirkt hauptsächlich gegen anaerobe Bakterien, darunter Streptokokken. Die in Abb. 6 gezeigte Retrosynthese¹³ der Tetransäure verwendet die biomimetische Lacey-Dieckmann-Cyclisierung (siehe Abschnitt 2.4.1), welche von dem β -Ketoamid **15** ausgeht.

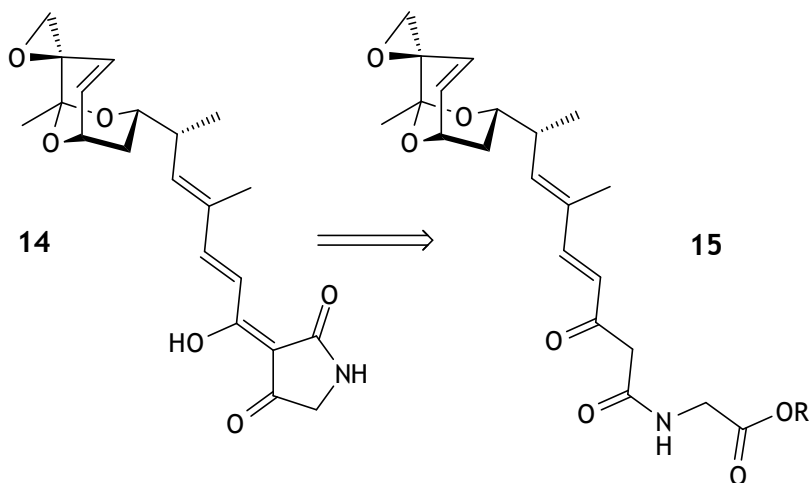


Abb.8: erster Schritt einer Retrosynthese¹³ von Tirandalydigin **14**

Strukturell äußerst interessant ist das fast vollständig symmetrische dimere Polycephalin C **16** aus dem Pilz *Physarum polycephalum*¹⁴, welches aus zwei, über ein Cyclohexen verbundenen, Trienoyltetransäuren besteht. Abb. 9 zeigt den retrosynthetischen Vergleich der von Ley et al. publizierten Synthese¹⁵ über eine doppelte Stille- Kupplung mit Stannan **17** und einer alternativen Möglichkeit, die das im Rahmen der vorliegenden Dissertation etablierte Ylid **18** bietet.

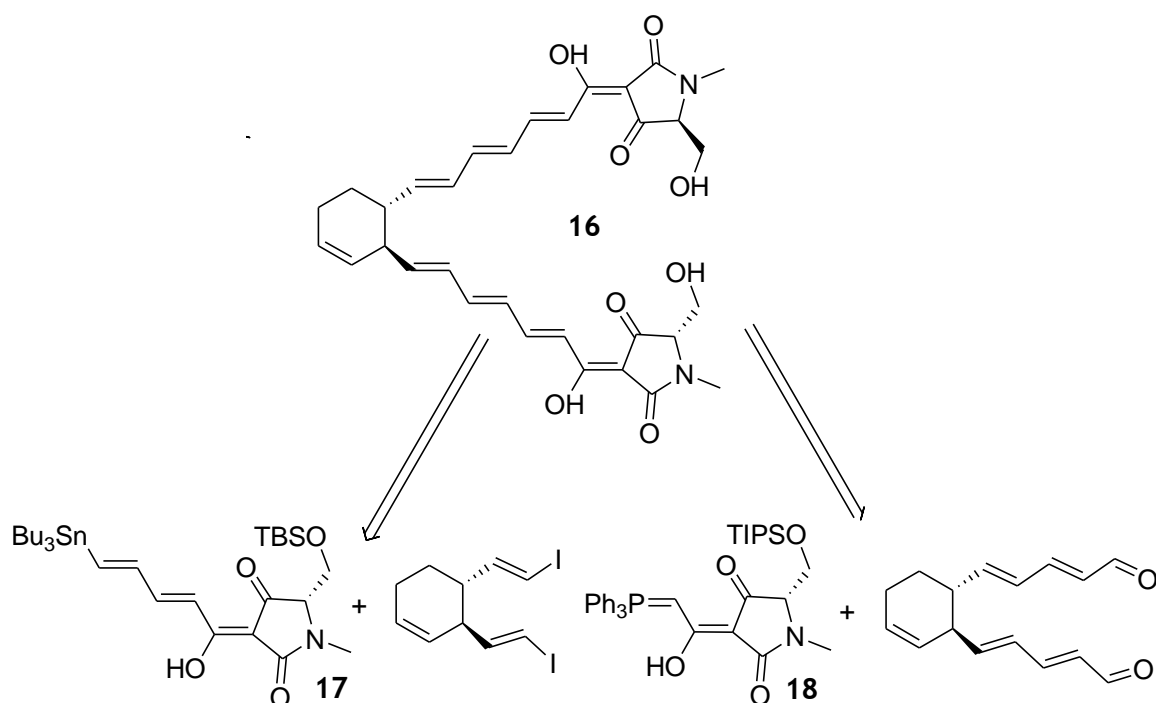


Abb.9: zwei mögliche Retrosynthesen für Polycephalin C 16

2.5 Decalinoyltetransäuren

Biosynthetisch entstehen die Decalingerüste durch intramolekulare Diels-Alder-Cycloaddition der Oligoenoyl-Seitenkette. Meist bleibt die nach der Diels-Alder Reaktion übrig gebliebene Doppelbindung im Ring erhalten, so dass man eigentlich nicht von Dekahydronaphthalin- (kurz Decalin), sondern Octalinderivaten sprechen kann. Hymenoseitin **23** wurde 2015 von Opatz et al.¹⁶, dargestellt. Abb.10 zeigt die Schlüsselschritte dieser Synthese. (+)-Citronellal **19** wird in den chiralen Aldehyd **20** überführt, welcher in einer intramolekularen Diels-Alder-Addition mit BF_3 -Etherat selektiv zum Octalinderivat **21** zyklisiert. Allgemein gesprochen reagiert bei der Diels-Alder-Addition das HOMO des Diens mit dem LUMO des Dienophils. Die Aldehyd-Carbonylgruppe erleichtert die Reaktion, da sie durch den elektronenziehenden Effekt das **LUMO energetisch erniedrigt**. Die Stereoselektivität dieser Reaktion entsteht durch den sesselförmigen Übergangszustand, welcher sich so formt, dass die Methylgruppe am Stereozentrum äquatorial steht und das Dienophil sich dem Dien in endo-Konformation annähert. Unter diesem Aspekt kommt dem Aldehyd eine weitere Bedeutung zu, **weil die π -Orbitale der Carbonylgruppe Elektronendichte in die unbesetzten π^* -Orbitale des Diens schieben können und somit die Energie des HOMOs erhöht wird**. An diesen Aldehyd **21** wird nach Reformatsky Methylbromoacetat addiert und danach zum β -Ketoester oxidiert. Aminolyse mit einem geschützten Threoninderivat führt zum analogen β -Ketoamid **22**; Lacey-Dieckmann-Zyklisierung (siehe Abschnitt 2.10.1) und Entschützung bilden den Abschluss dieser Synthese.

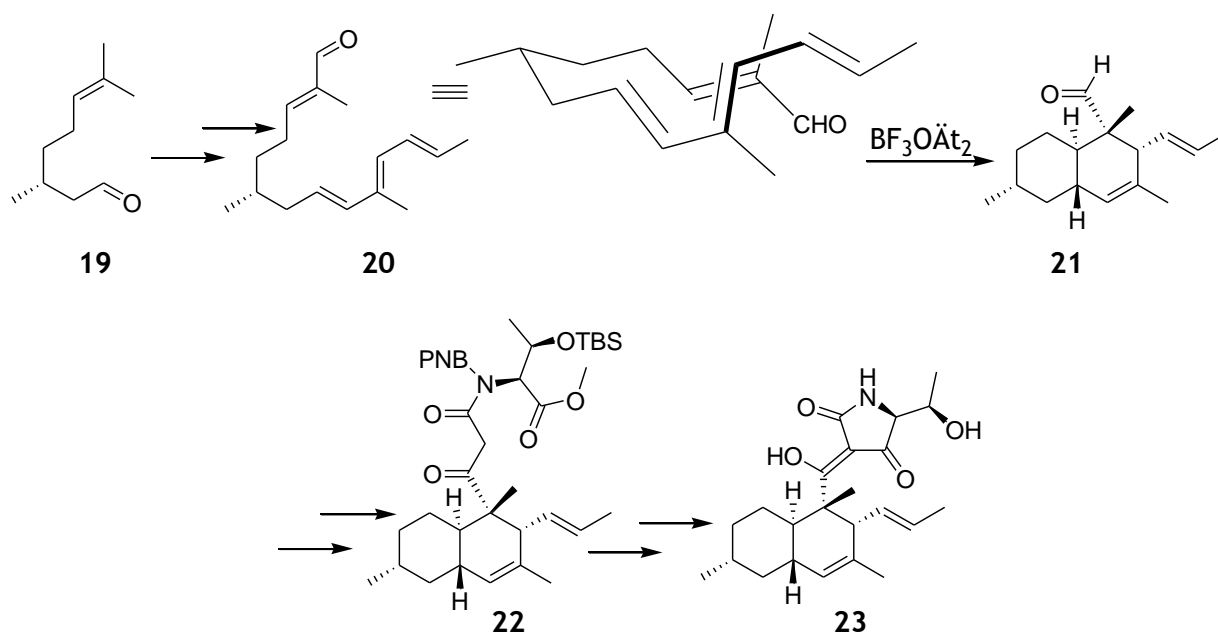


Abb.10: Synthese von Hymenosectin 23

Ganz ähnlich waren im Jahr 2000 schon Ley et al.¹⁷ bei der Synthese zum Equisetin 27 vorgegangen (Abb.11). Die Ausgangssubstanz (+)-Citronellol 24 wurde verlängert zum β -Ketothioester 25, welcher sich allerdings unter Zugabe von Aluminium- Salzen zersetzte. Mit Lithiumperchlorat verlief die IMDA stereoselektiv zum Octalinderivat 26. Das Standardprotokoll aus Aminolyse, Lacey- Dieckmann- Zyklisierung und Entschützung lieferte Equisetin 27.

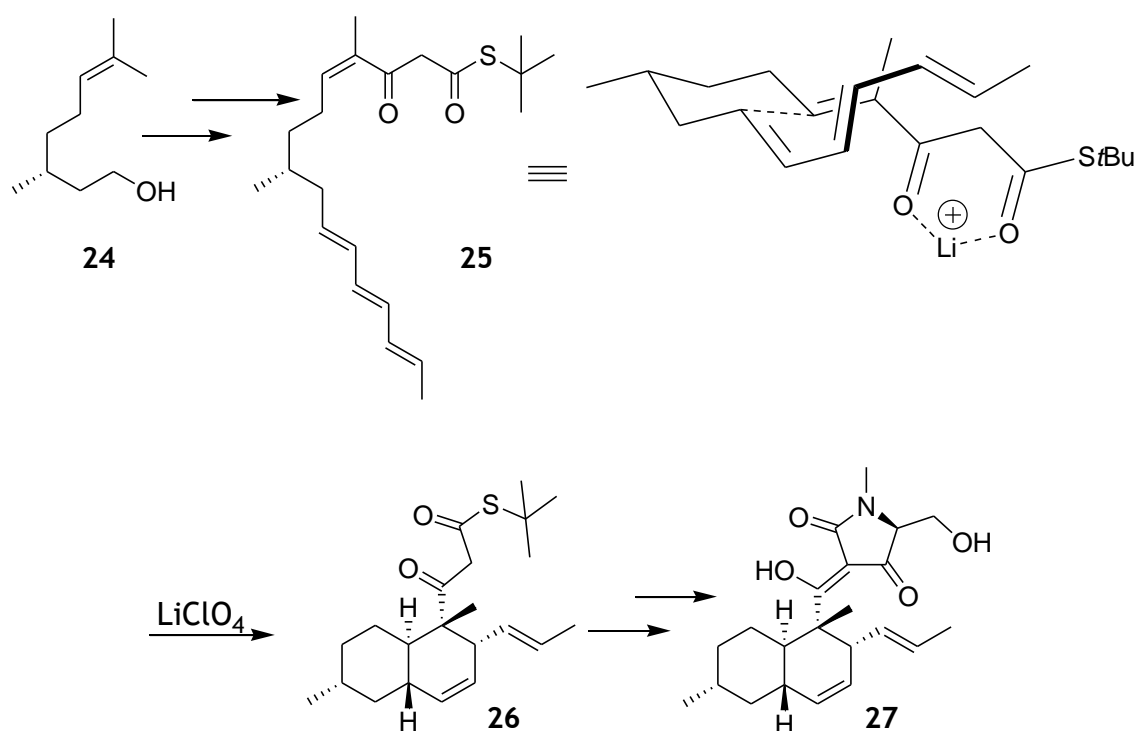


Abb.11: Synthese von Equisetin 27

Weitere Decalinoyltetramsäuren sind die Zopfiellamide, welche aus dem obligat marinen Pilz *Zopfiella latipes* isoliert¹⁸ wurden. Hier ist die Decalinsäure nicht direkt, sondern über eine Äthin-Brücke an die Tetramsäure acyliert. Letztere entstammt einer nicht proteinogenen Aminosäure, dem γ -Hydroxy, γ -isopropyl-glutamat. Die biologische Aktivität reicht von antibakterieller bis zu fungizider Wirkung.

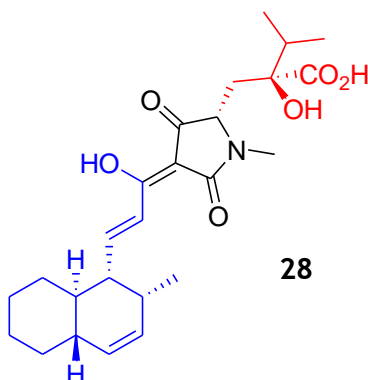


Abb.12: Struktur von Zopfiellamid **28**

Die strukturell neue hexacyclische Tetramsäure Integramycin **29** (Abb.13) wurde aus einem Bacterium der Art *Actinoplanes* isoliert¹⁹. Bemerkenswert ist die 5-hydroxylierte Tetramsäureeinheit und das hochfunktionalisierte Decalin. **29** inhibiert den DNS-Strang austausch durch rekombinante HIV-1-Integrase mit einem IC₅₀-Wert von 4 μ M.

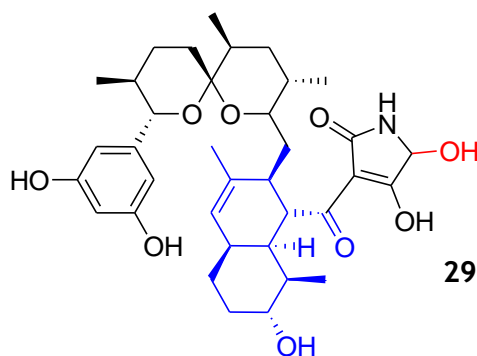


Abb.13: Struktur von Integramycin **25**

Erst 2015 wurde Spiroscytalin **30** aus dem Pilz *Scytalidium cuboideum* isoliert²⁰. Es weist als Alleinstellungsmerkmal eine spirocyclische Verknüpfung zwischen C-3 der Tetramsäure und Decalin auf, wodurch die Verbindung keine Säure mehr ist. Weiterhin außergewöhnlich ist die cis- Konfiguration des Decalinsystems sowie die postulierte Herkunft vom nicht proteinogenen D- Phenylalanin.

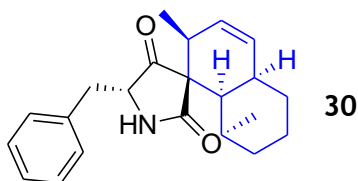


Abb.14: Struktur von Spiroscytalin **30**

2.6 Makrocyclische Tetransäuren

Vorläufer der Tetransäureeinheit für den hitzestabilen Antifungalfaktor HSAF **31** (Abb.15) ist β -Hydroxyornithin. Dessen δ -Aminogruppe bildet mit der ω -Carboxylgruppe an der 3-Acylseitenkette das Makrolactam.

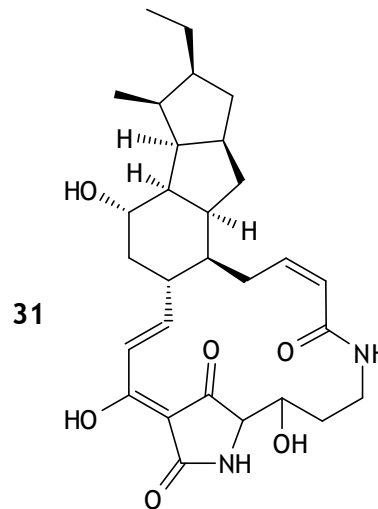


Abb.15: Struktur von HSAF **31**

31 wird von *Lysobacter enzymogenes* Stamm C3 unter Nahrungsmangelbedingungen produziert und wirkt, wie der Name schon andeutet, gegen eine Vielzahl an Pilzen. Völlig einzigartig ist dabei aber die Tatsache, dass **31** spezifisch deren Biosynthese bestimmter Sphingolipide blockiert, die essentiell für das polare Hyphenwachstum von filamentösen Pilzen sind²¹.

2.7 N-Acyl-Tetransäuren

Ein Beispiel hierfür ist das N-Peptidoacyl-methyltetramat Dolastatin **31** (Abb.16). Die Peptidyl-Seitenkette wird biosynthetisch an der nichtribosomalen Peptidsynthetase hergestellt und enthält auch nicht proteinogene N-Methyl- und N,N-Dimethylaminosäuren.

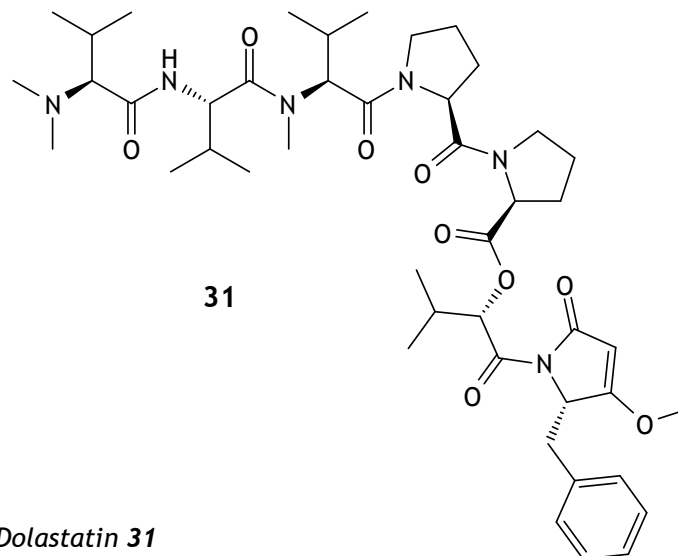


Abb.16: Struktur von Dolastatin **31**

Dolastatin stammt aus dem marinen Mollusken *Dolabella auricularia* (Seehase aus dem Indischen Ozean, eine Nacktschnecke, Abb.17²²). **31** wirkt cytostatisch, weil es nach Applikation zum Zellzyklusarrest am G2/M-Kontrollpunkt kommt. Dabei wird Apoptose

sowohl über den mitochondrialen als auch über den extrazellulären Fas/Fas-Ligand-Regulationsweg induziert. Außerdem inhibiert **31** die Gefäßneubildung.



Abb.17: *Dolabella auricularia*²³

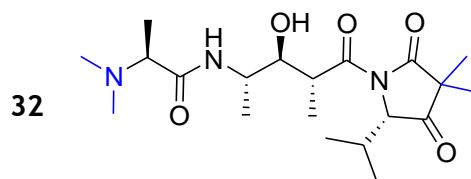


Abb.18: Struktur von Janolusimid B **32**

Eine strukturverwandte Verbindung, Janolusimid B **32**, weist ebenfalls am Ende des N-Acylrestes eine Dimethylaminogruppe auf. Die enthaltene Tetramsäure ist aber nicht O-, sondern doppelt C- methyliert. **32** wurde im Moostierchen *Bugula flabellata* gefunden, gesammelt von den Seilen einer Neuseeländischen Muschelfarm²⁴. Interessanterweise wurde aus der mediterranen Nacktschnecke *Janolus cristatus* das N-Monomethylanalog Janolusimid extrahiert. Da Nacktschnecken zu bekannten Räubern der Moostierchen gehören, kann die N-Methylierung ein Hinweis sein auf eine Derivatisierung von chemischen Abwehrstoffen¹⁹.

2.8 Alkaloid- Tetramsäuren

Eine neu identifizierte Serie dieser Substanzen wurde aus dem endophytischen Pilz *Aspergillus versicolor* extrahiert. Die Aspergilline²⁵ zeichnen sich durch die für diese Klasse typische **Tryptophan- abgeleitete Tetramsäure** aus, welche allerdings hier Teil eines hoch oxydierten hexacyclischen Gerüsts ist.

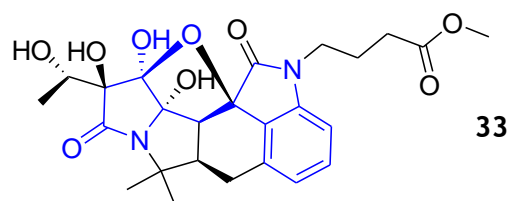


Abb.19 : Aspergillin E **33**

2.9 Tetramsäuren als Abbauprodukte von N-Acyl-Homoserinlactonen

Bakterien können unter bestimmten Bedingungen wie ein vielzelliger Organismus „zusammenarbeiten“. Dazu ist ein Phänomen nötig, das als Quorum sensing bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um die Fähigkeit der einzelnen Zelle im Konsortium, zu merken, wie viele andere Zellen gerade um sie herum existieren. Erstmals erkannt wurde dieses Phänomen bei *Vibrio fischeri*. Kolonien dieser Bakterienart zeigen nämlich ab einer bestimmten Zelldichte Biolumineszenz. Der molekulare Mechanismus besteht in der Synthese von kleinen Signalmolekülen, sogenannten Autoinduktoren, die einerseits ihre eigene Biosynthese und andererseits bestimmte Gencluster aktivieren, deren Expressionsniveaus von der Zelldichte abhängen sollen. Im Falle der Vibrionen handelt es sich dabei um das *Lux*-Operon. Erst ab einer bestimmten Zelldichte befindet sich eine genügend hohe Konzentration an Autoinduktor im Medium, sodass die davon abhängigen Gene angeschaltet werden. Ein besonders bedeutsames Phänomen, dem dieser Mechanismus zugrunde liegt, ist die Bildung von Biofilmen durch Bakterien. Einzelne Zellen können oftmals sehr gut im Körper vom Immunsystem erkannt und bekämpft werden. Bilden sich jedoch Biofilme, in denen die Zellen oft noch durch extrazelluläre Matrices wie Schleime geschützt sind, kann eine lebensbedrohende Situation entstehen. Ebenso wie der Zahnbelag im kleinen Maßstab stellen Biofilme in der mikrobiologischen Verfahrenstechnik im großen Maßstab Probleme dar, wenn Rohrleitungen durch das „Froschlaichbakterium“ *Leukonostoc mesenteroides* verstopft werden.

Eine häufig auftretende Klasse von Autoinduktoren sind die N-Acyl-homoserinlactone, die ihren Informationsgehalt als Signalmoleküle von der unterschiedlichen Fettsäureseitenkette erhalten. Vor kurzem wurden auch para-Cumaroyl-homoserinlactone entdeckt und ihre Biosynthesegene untersucht²⁶. Kaufmann et al²⁷. fanden heraus, dass N-Acyl-homoserinlactone im Medium von *Pseudomonas aeruginosa* nicht nur in die azyklische N-Acylaminosäure hydrolysiert werden, sondern spontan zur von Homoserin abgeleiteten Tetramsäure zyklisieren können. Dies geschieht wie die enzymatische Biosynthese über eine Dieckmann-Kondensation. Diese Tetramsäuren haben sowohl antibiotische Wirkung gegen ein breites Spektrum gram-positiver Bakterien- wohingegen keine Toxizität gegen gram negative Keime beobachtet wurde- als auch siderophore Eigenschaften. Eisenionen sind schlecht löslich und damit für Mikroorganismen schwer verfügbar. Trotzdem werden sie für viele Metalloenzyme benötigt. Pseudomonaden sind sowieso für die Produktion von einer Vielzahl fluoreszierender Siderophore, beispielsweise der Pyoverdine, bekannt, welche essentiell für die Virulenz sind²⁸. Trotzdem nutzen sie auch die Tetramsäuren²⁷, die mit dem 3-Acyl- und dem 2-Carbonylsauerstoffatom zwei Koordinationsstellen im oktaedrischen Ligandenfeld des Eisenions besetzen (Abb.20). Die apolaren Fettsäureseitenketten

verbessern die Membrangängigkeit, um die Aufnahme in die Zelle zu erleichtern. Außerdem existiert in den meisten Bakteriengenomen eine Vielzahl verschiedener Transporter, die spezifisch einzelne Siderophor- Eisen- Komplexe erkennen und ins Cytosol befördern.

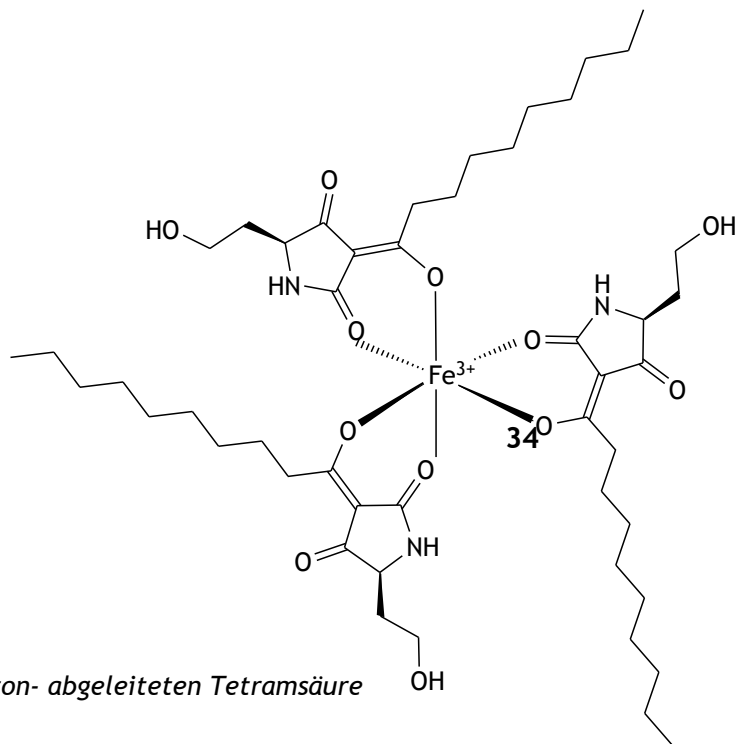


Abb.20: ternärer Komplex **34** aus Fe^{3+}
und der vom N-Decanoyl-homoserinlacton- abgeleiteten Tetransäure

2.10. Synthesemethoden für Tetransäuren

2.10.1 Lacey-Dieckmann-Cyclisierung

1954 veröffentlichte Lacey die erste zweistufige Synthese von Tetransäuren.²⁹ Aus Glycinethylester **35** und Diketen **36** synthetisierte er das β -Ketoamid **37** (Abb.21). Dieses reagierte mit starken Basen im Sinne einer Dieckmann-Kondensation zur 3-Acetyl-tetransäure **21**. Dabei handelt es sich um eine nucleophile Substitution an der Ester-Carbonylgruppe, welche vom Enolat der 1,3-Dicarbonylverbindung angegriffen wird, oder anders ausgedrückt, um eine intramolekulare Acylierung einer C-H-aciden Verbindung.

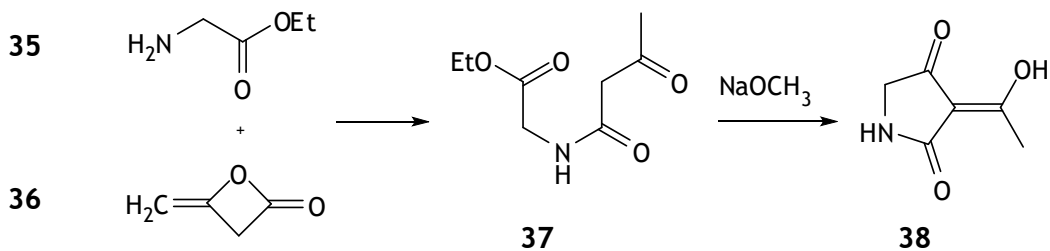


Abb.21: Lacey-Dieckmann-Cyclisierung zur Synthese von 3-Acetyl-tetransäure **38**

2.10.2 Pyrolyse von C-Aminoacyl-Meldrum's Säure

Eine andere Synthese von Tetramsäuren geht von Meldrum's Säure **39** aus. Diese oder ein analoges Derivat (**50**, siehe Abb.24, Abschnitt 2.11) kann einerseits zum β -Keto-amid umgesetzt werden, wonach eine Lacey-Dieckmann-Cyclisierung zur Tetramsäure führt.

Alternativ wird Meldrum's Säure **39** mit einer N-geschützten Aminosäure C-acyliert. Zur Aktivierung der Carbonsäure dient zum Beispiel Dicyclohexylcarbodiimid oder Isopropenylchlorocarbonat. Letzteres hat den Vorteil, dass nicht der schwer abtrennbare Dicyclohexylharnstoff entsteht. Die C-Acyl-Meldrum's Säure wird dann unter Verlust von CO_2 und Aceton pyrolysiert. Damit erhält man direkt die freie Tetramsäure. Dies ist vor allem bei Naturstoffen sinnvoll, die nicht 3-substituiert sind oder sich dort leicht acylieren lassen. Als Beispiel hierfür soll die Synthese der Tetramsäureeinheit für Dolastatin **31** von Pettit et al. dienen³⁰.

Die N-Acyltetramsäureeinheit wurde in zwei Schritten aus **39** und N-Acyl-Phenylalanin⁷⁷ **40** hergestellt (Abb.22). Der Mechanismus für diese Reaktion verläuft vermutlich folgendermaßen: Während der Pyrolyse der C-Acyl-Meldrum's Säure **41**, entsteht intermediär ein Acylketen, welches intramolekular zur Tetramsäure **42** cyclisiert.

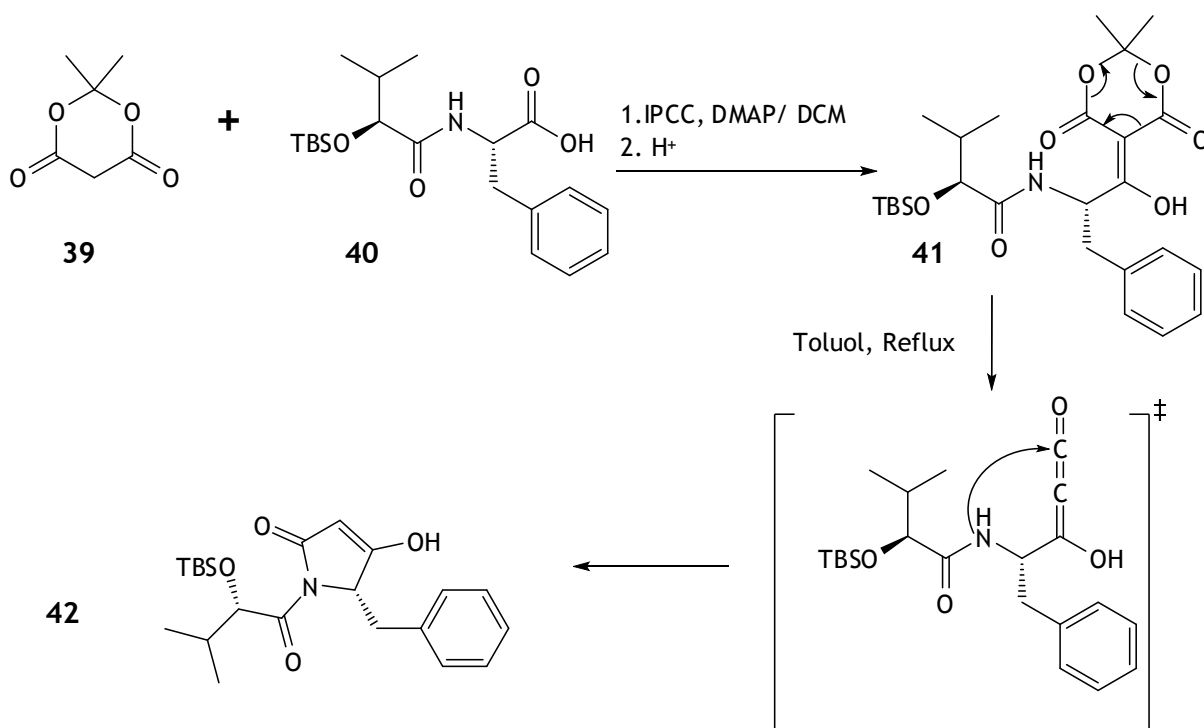


Abb.22: Schlüsselschritte der Synthese von Pettit et al.³⁰ für die Tetramsäureeinheit **42** von Dolastatin **31**, ausgehend von Meldrum's Säure **39** und einem N-Acyl-Phenylalaninderivat **40**

2.10.3 Dominosynthese

Die von Schobert et al. etablierte Dominoreaktion von α -Aminosäureestern mit Ketenylidetriphenylphosphoran **43**³¹ ist in Abb. 23 am Beispiel des in vorliegender Arbeit verwendeten O-Benzyl-N-methyl-threoninmethylester **44** gezeigt. Zunächst wird Ketenylidetriphenylphosphoran **43** durch Addition eines Elektrophils, hier ein Proton, aktiviert. Ist das Amin ein besseres Nucleophil als **43**, so bildet sich das Amidylid **45**. Getrieben durch die hohe Bindungsenthalpie von Phosphor-Sauerstoff-Bindungen laufen schließlich als Wittig-Olefinierung eine [2+2]-Cycloaddition zum Phosphooxetan **46** und eine Cycloreversion zum Tetramat **47** ab.

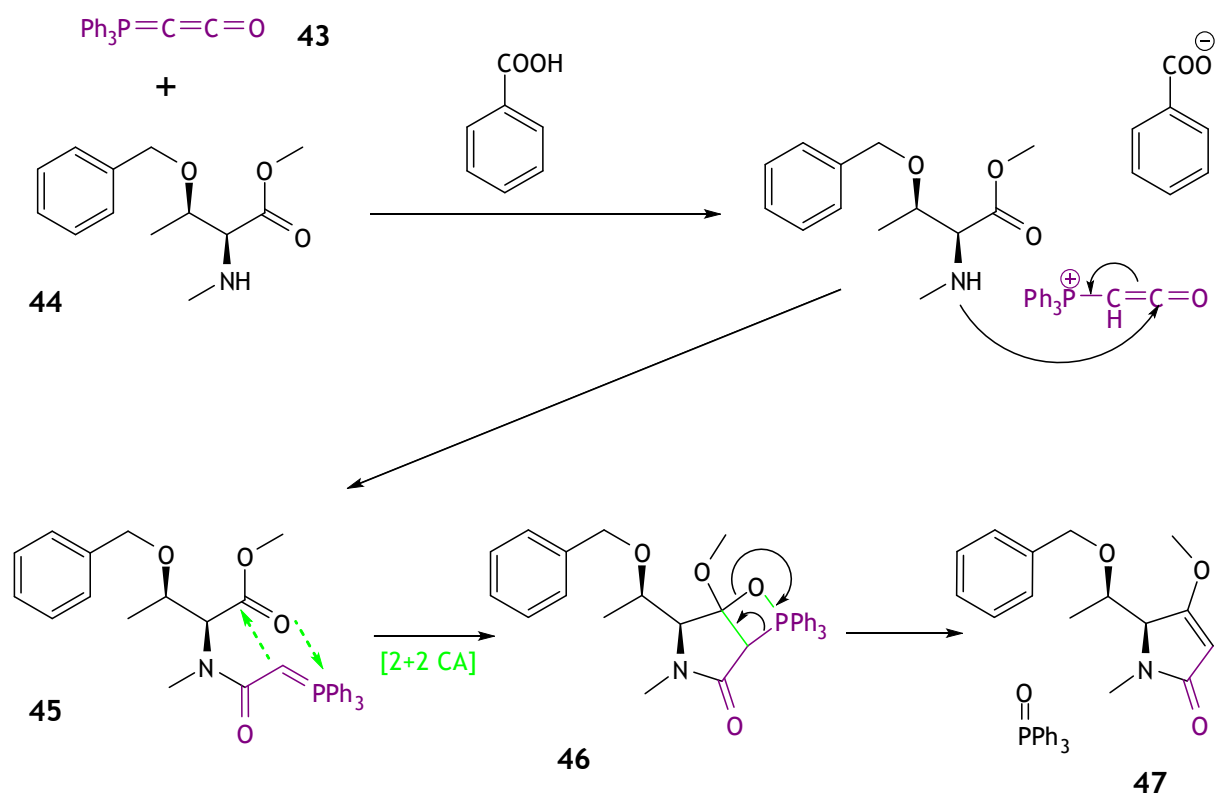


Abb.23: Synthese von Tetramaten via Dominoreaktion von Aminosäureestern mit Ketenylidetriphenylphosphoran **43** am Beispiel von O-Benzyl-N-methyl-threoninmethylester **44**

2.11 Synthese von Oligoenoyltetramsäurederivaten

Eine Methode für die Synthese von Oligoenoyltetramsäurederivaten wurde in Abschnitt 2.10.1 bereits angesprochen. Dabei wird das Oligoenosystem zuerst fertiggestellt und dann in das β -Ketoamid überführt, welches anschließend cyclisiert wird.

Alternativ gingen Boeckmann et al.³² bei der Synthese von Tirandamycin **48** vor (Abb.24). Sie stellten ein Phosphonat-terminiertes β -Ketoamid **49** aus einer Meldrum's Säure-analogen Verbindung **50** und N-DMB-Glycinethylester **51** her. Das Oligoenoylsystem wurde dann nach der Cyclisierung zur Tetramsäure **52** aus einem α,β -ungesättigten Aldehyd **53** in einer Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion aufgebaut.

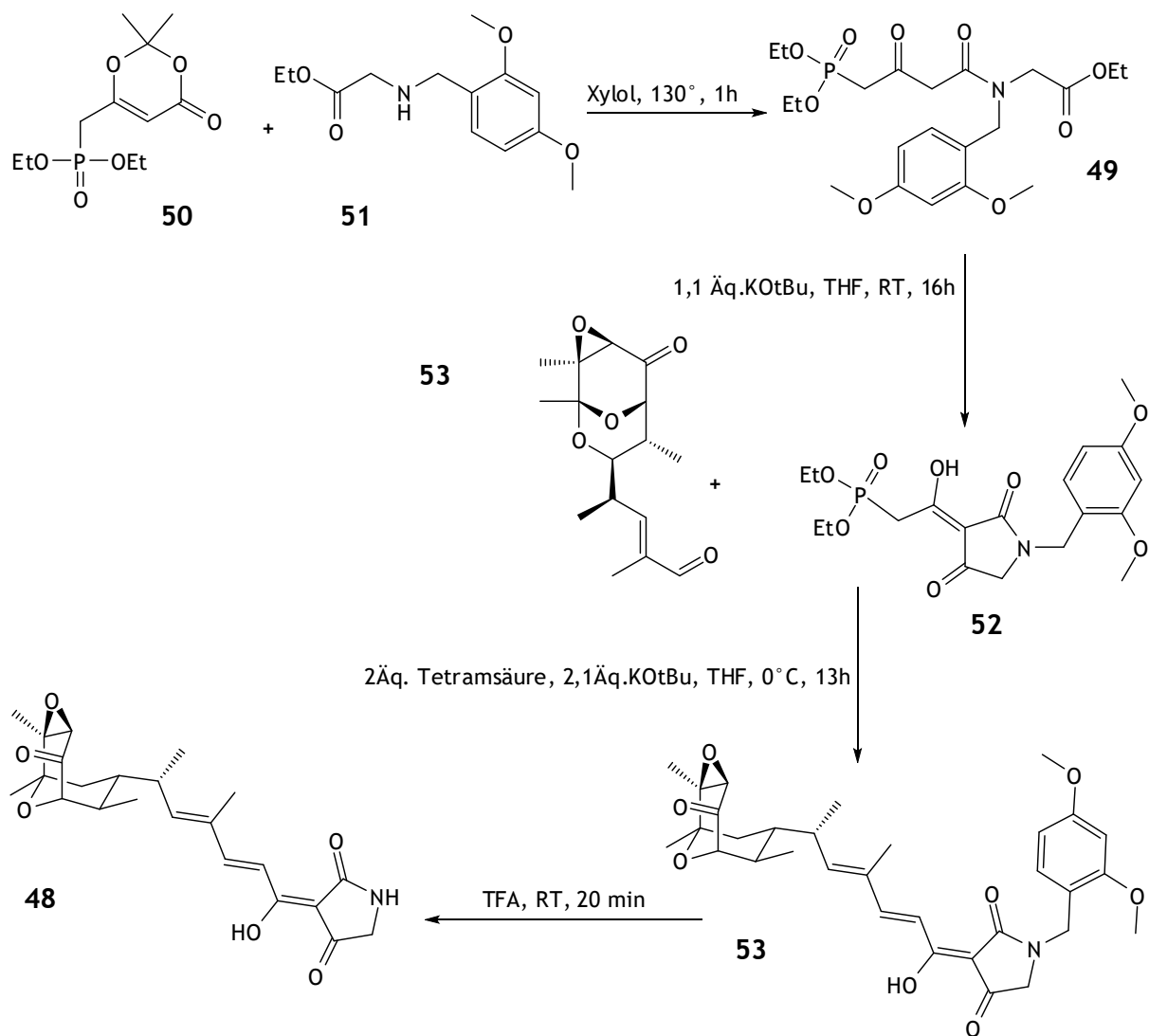


Abb.24: Synthese von Tirandamycin **48** nach Boeckmann et al. über eine Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion

3. Vorstellung der Teilprojekte (Σύνοψη)

Das Thema „Synthese von 3-Acyltetramsäurederivaten und deren Markierung zur Visualisierung in Zellen“ wurde vom Anfang der Diplomarbeit im April 2008 an in drei eigenständigen Aufgabenblöcken bearbeitet. Diese bestanden in der Funktionalisierung zur Markierung, der Acylierung mit Ketenylidentriphenylphosphoran **43** und der Naturstoffsynthese.

Zum Zweck der Markierung bestand der allgemeine Plan in der 3-Acylierung einer Tetramsäure mit einer ω -funktionalisierten Seitenkette. Diese sollte zur Anknüpfung eines Moleküls zum Sichtbarmachen im Fluoreszenzmikroskop dienen. Zunächst wurde versucht, einen terminalen Alkohol oder ein Amin zu verwenden, welches in vitro mit der Säuregruppe von Biotin oder Fluorescein reagieren kann. Allerdings traten dabei zwei wesentliche Probleme auf: einerseits neigen lange Alkylketten zur Rückfaltung, was die Reaktivität der endständigen Nukleophile deutlich herabsetzt. Deshalb ließ sich die ω -Hydroxysäure nicht verethern. Andererseits wurde von mir die analoge aminofunktionalisierte 3-Acyltetramsäure zwar auf zwei Arten dargestellt, aber die entschützte Aminotetramsäure ist eine hochpolare zwitterionische Verbindung wodurch sowohl die Isolierung, als auch die Reinigung sich problematisch gestalteten. Viel unproblematischer verlief allerdings die Darstellung der Seitenketten mit terminalem Alkin, welche in zwei unterschiedlichen Längen und jeweils als Säure über Yoshii und als Aldehyd über Wittig an verschiedene Tetramsäuren und Heteroanaloge bzw. deren Ylide angeknüpft wurden. Weiterhin wurde eine zweite Möglichkeit zur Markierung erarbeitet, die mittels eines Bisazids sowohl Visualisierung als auch Isolierung von Zielproteinen durch Photomarkierung erlauben soll.

Ein zweiter Block sah die 3-Acylierung einer Tetramsäure mittels Ketenylidentriphenylphosphoran **43** vor. Das dadurch entstehende Acylylidensystem sollte im Folgenden unter Einsatz verschiedener Basen so aktiviert werden, dass es in einer Wittig-Olefinierung zu 3-Oligoenoyltetramsäuren reagieren kann.

Die dritte Aufgabe war die Totalsynthese von natürlichen 3-Acyltetramsäuren. Das erste Ziel war Penicillenol C. Die strukturellen Besonderheiten stellen dabei die Hydroxy- und die N-Methylgruppe im Threonin und die α -Methylverzweigung sowie die Doppelbindung in der Seitenkette dar. Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit noch die Penicillenoile B1 und B2 sowie die Decalinoyltetramsäuren Allo-Methiosetin und TA-289 synthetisiert.

3.1 Markierung von 3-Acyltetramsäuren

Zu Beginn meines Projektes waren die Synthesen der Melophline im AK Schobert etabliert³⁷; auch auf die antibiotischen und cytotoxischen Eigenschaften dieser Verbindungen wurde bereits hingewiesen (*vide supra*). Melophlin C wurde als Beispiel ausgewählt, da es in jüngeren Proliferationstests im Vergleich mit anderen Melophlinen die höchste Wirksamkeit gegenüber Zelllinien von Mausfibroblasten, Gebärmutterhalskrebs, Nierenkrebs und Leukämie aufwies⁴.

Bei den Melophlinen handelt es sich um strukturell einfache N-Methyl-3-Acyltetramsäuren, wobei die Seitenketten lange Fettsäurederivate sind, die teilweise eine Methylverzweigung enthalten.

Es existieren mannigfaltige Testmöglichkeiten, um die Wirkung solcher Substanzen anhand der sekundär auftretenden Effekte zu untersuchen. Die einfachste Methode zur Untersuchung auf Cytotoxizität ist das Anfärben der Zellen mit Farbstoffen wie dem Triarylmethanderivat Phloxin, die nur tote Zellen zeigen³³. Der MTT-Test³⁴ (Abb.25) verwendet das Tetrazoliumsalz **54**, welches auf verschiedene Arten in der Zelle zum violett gefärbten Formazan **55** reduziert wird. Einerseits spielen hierbei die mitochondrialen Succinat-Dehydrogenasen aus der Atmungskette eine Rolle, andererseits reagieren auch cytosolisches NADH und NADPH. In jedem Fall ist für Nachbildung von NADH eine funktionierende Glykolyse, für Succinat der Citratcyclus und für NADPH der oxidative Pentosephosphatweg essentiell, sodass die Menge an lebenden Zellen photometrisch über die Farbvertiefung bestimmt werden kann.

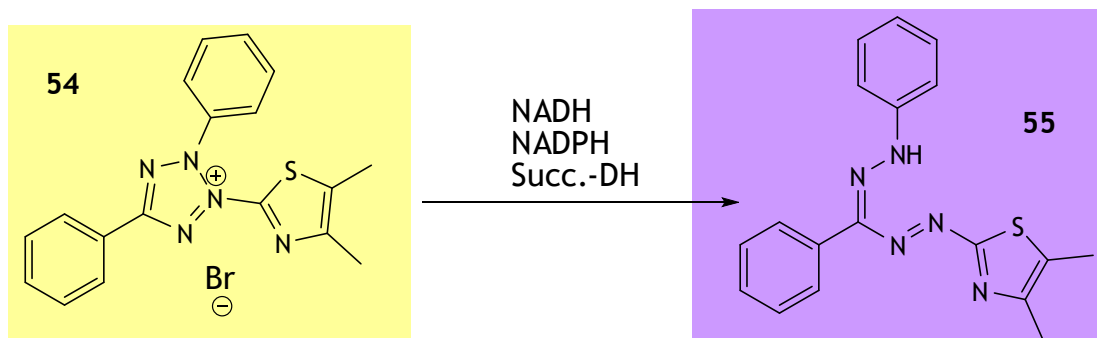


Abb.25: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazol-3-ium bromid **54** geht durch zelluläre Reduktionsäquivalente in das violett gefärbte (2Z,4E)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan **55** über.

Um besseren Einblick in die Wirkungsweise potenzieller Medikamente zu bekommen, beziehen genauere Untersuchungen auch die Art des Zelltodes mit ein. So kann man anhand der Messung des Mitochondrialen Membranpotentials apoptotische Zellen erkennen, bei denen die Mitochondrien lysiert werden. Standardmäßig können auch die Regulationswege der Apoptose über das Auftreten von Effektorproteinen wie Caspasen dargestellt werden.

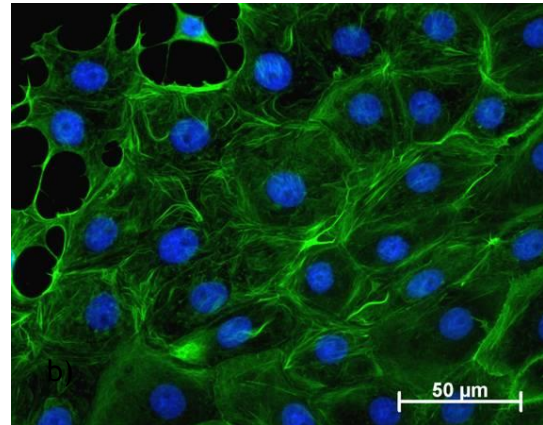
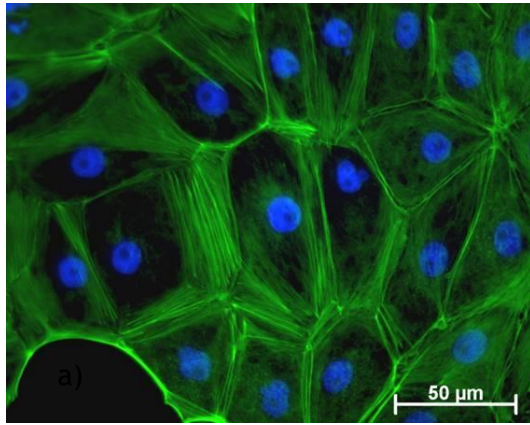


Abb.26: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A-498 Nierenkrebszellen mit Darstellung der Zellkerne in blau und des Aktin-Cytoskelettes in grün³⁵

a) intakte Zellkultur

b) mit Melophlin A behandelte Zellkultur; Hier ist deutlich ein Verlust der Integrität des Cytoskelettes zu erkennen.

Besonders aufschlussreich ist die Fluoreszenzmikroskopie (Abb.26). Dabei werden verschiedene Zellkompartimente spezifisch angefärbt, sodass man Veränderungen in deren Struktur über die Zeit beobachten kann. Damit lassen sich immerhin schon die sekundären Effekte der wirkenden Substanz zellulär lokalisieren. Das Ziel zur Entwicklung eines erfolgreichen Medikamentes muss aber sein, eine genaue Struktur-Wirkungsbeziehung aufzustellen. Dadurch kann die Leitstruktur so verändert werden, dass die Wirkung verstärkt, die Pharmakokinetik verbessert und Nebenwirkungen reduziert werden. Um dies zu erreichen, muss aber der genaue Wirkort in der Zelle und der primäre Bindungspartner gefunden werden. Potentielle Bindungspartner sind Enzyme, Gerüstproteine, Nukleinsäuren oder Membranen. Für eine Eingrenzung der Suche muss also zunächst die Verteilung des Wirkstoffes in der Zelle untersucht werden. 3- Acyltetramsäuren zeigen keine Fluoreszenz, durch die sie direkt lokalisiert werden könnten. Zudem sind so kleine Moleküle nicht immunogen, was die Herstellung passender Antikörper erschwert. Deshalb bleibt nur noch die Möglichkeit, das Melophlinmolekül chemisch zu modifizieren. So kann einerseits ein Fluoreszenzfarbstoff direkt angeknüpft, oder das Melophlin biotinyliert werden. Kommerziell erhältliches, fluoreszenzmarkiertes Avidin, ein stark Biotin- bindendes Protein aus Vogeleiern, ermöglicht dann die Detektion. Ein inhärentes Problem beider Methoden ist, dass die Eigenschaften des Wirkstoffes dadurch stark verändert werden, was die Aufnahme in die Zelle, die Verteilung im Cytosol und die Wechselwirkung mit potentiellen Bindungspartnern beeinflussen kann. Ein neuer Denkansatz dazu, angeregt durch Kolb et al.³⁶, wurde von mir bereits in meiner Diplomarbeit folgendermaßen vorgeschlagen und könnte diese Probleme minimieren (Abb.27).

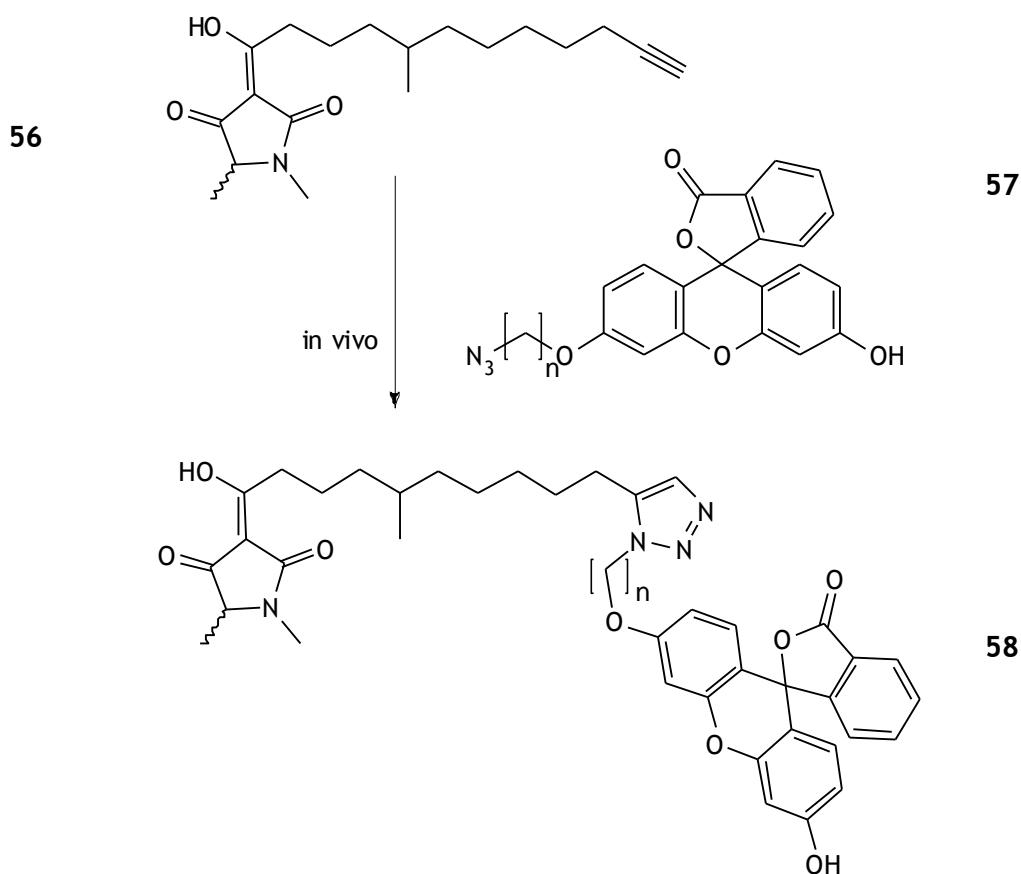


Abb.27: Möglichkeit zur Markierung von Melophlin C mit Fluorescein mittels in situ Klick-Chemie

Würde man Melophlin C mit terminalem Alkin in der Seitenkette **56** herstellen, so würde sich das Derivat sterisch und elektronisch wesentlich weniger von der Stammverbindung unterscheiden, als das Biotinkonjugat. Nach einer Inkubationsphase, in der sich der Wirkstoff in der Zelle verteilt, könnte man ein Biotinyl- bzw. Fluoreszeinyl-Azid **57** zugeben, welches, sofern es die Membran passieren kann, das Melophlin erst dann als Triazol **58** markiert, wenn es schon als Komplex mit seinem Bindungspartner vorliegt. Ein besseres Markierungsreagenz ist Hydroxycoumarinazid, welches selbst nicht fluoresziert und somit nach der Reaktion nicht ausgewaschen werden muss. Erst das durch die Klick- Reaktion entstehende Triazolyl-Coumarin fluoresziert (Abb. 37).

In jedem Fall ist allerdings das Vorhandensein einer funktionellen Gruppe im zu untersuchenden Wirkstoff nötig. Der Tetraam säuregrundkörper in den Melophlinen bietet wenige Möglichkeiten für das Einführen einer Funktionalität. Eine Chance wäre höchstens, die von Lysin statt Alanin abgeleitete Tetraam säure zu verwenden. Da aber dieser Teil des Moleküls reich an Donatoren und Akzeptoren für Wasserstoff-brückenbindungen ist, stellt er eine sehr wahrscheinliche Wechselwirkungsfläche für die Bindung an seinen zellulären Partner dar. Aus diesem Grund erscheint eine ω -funktionalisierte Seitenkette sinnvoll. Selbst wenn die hydrophobe Alkylkette an der Wechselwirkung mit dem Bindungspartner beteiligt

ist, besteht die Möglichkeit, dass die Bindung nicht stark gestört wird, sofern das Kettenende auch im gebundenen Zustand des Melophlins frei der Lösung zugewandt bleibt. Abb. 28 zeigt die unter diesen Gesichtspunkten auf Grundlage der bereits erfolgten Totalsynthese von Schobert et al.³⁷ als erstes entwickelte Retrosynthese für eine Biotin-markierte 3-Acyltetramsäure **59** aus einem terminalen Amin **60**. Dieses wurde zunächst versucht zu erhalten aus dem Phthalimid **61**, dem Produkt der Jones- Acylierung von Dimethyltetramsäure **62** mit Säurechlorid **63**.

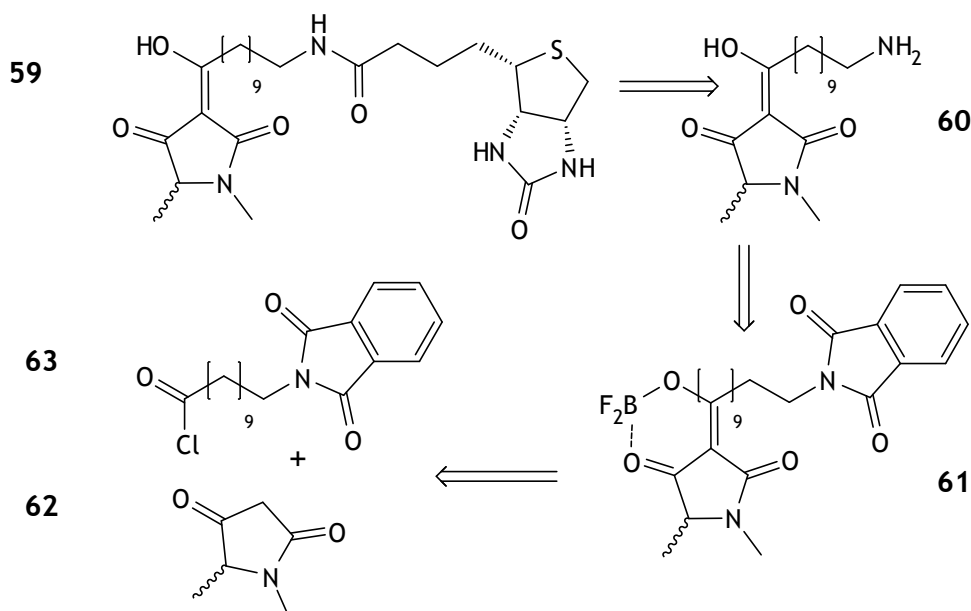


Abb.28: zunächst geplante Retrosynthese zur Darstellung eines Biotinyl-Melophlin-Derivates

3.1.1 Aufbau des Tetramsäuregrundkörpers von Melophlin C

Zum Aufbau des Tetramsäuregrundkörpers wurde zunächst die bereits bestehende Synthese von Schobert et al.³⁷ verwendet. Dazu wurde, wie in Abb.29 dargestellt, Chlorpropionsäurechlorid **64** mit Kalium-*tert*Butanolat in den Ester überführt. Dann wurde mittels Finkelsteinaustausch das Chlorid gegen Jodid substituiert und an dessen Stelle Methylamin eingeführt. Da diese Methode zur Synthese eines N-Methyl-alaninesters jedoch relativ aufwendig ist und auch nur 6% Ausbeute nach drei Stufen erzielt werden konnte, wurde alternativ D,L-Alanin in drei Schritten mittels Boc-Schutzgruppe in den analogen Methylester **71** überführt und nur am Schluss einmal destilliert. Dadurch konnte die Ausbeute auf 50% gesteigert werden. Noch billiger ist die dritte Synthese, die deshalb durchgeführt wurde, weil man erstens die Schutzgruppe für den Stickstoff einspart, zweitens kein giftiges DMS braucht und drittens das Benzyltetramat einfach abhydriert werden kann, wohingegen die gut wasserlösliche Tetramsäure **62** nach der Entschützung in wässriger HCl sehr schlecht in Organik rückzuextrahieren ist.

Die Darstellung von racemischem N-Methylalanin **73** aus 2-Bromopropionsäure³⁸ **72** in gesättigter wässriger Methylaminlösung ist recht einfach und das Produkt lässt sich in 74% Ausbeute aus Methanol umkristallisieren. Die darauffolgende sauer katalysierte Veresterung mit Wasserabscheider verläuft nur mit 28%, was aber angesichts der billigen Edukte und Reagentien kein Problem darstellt.

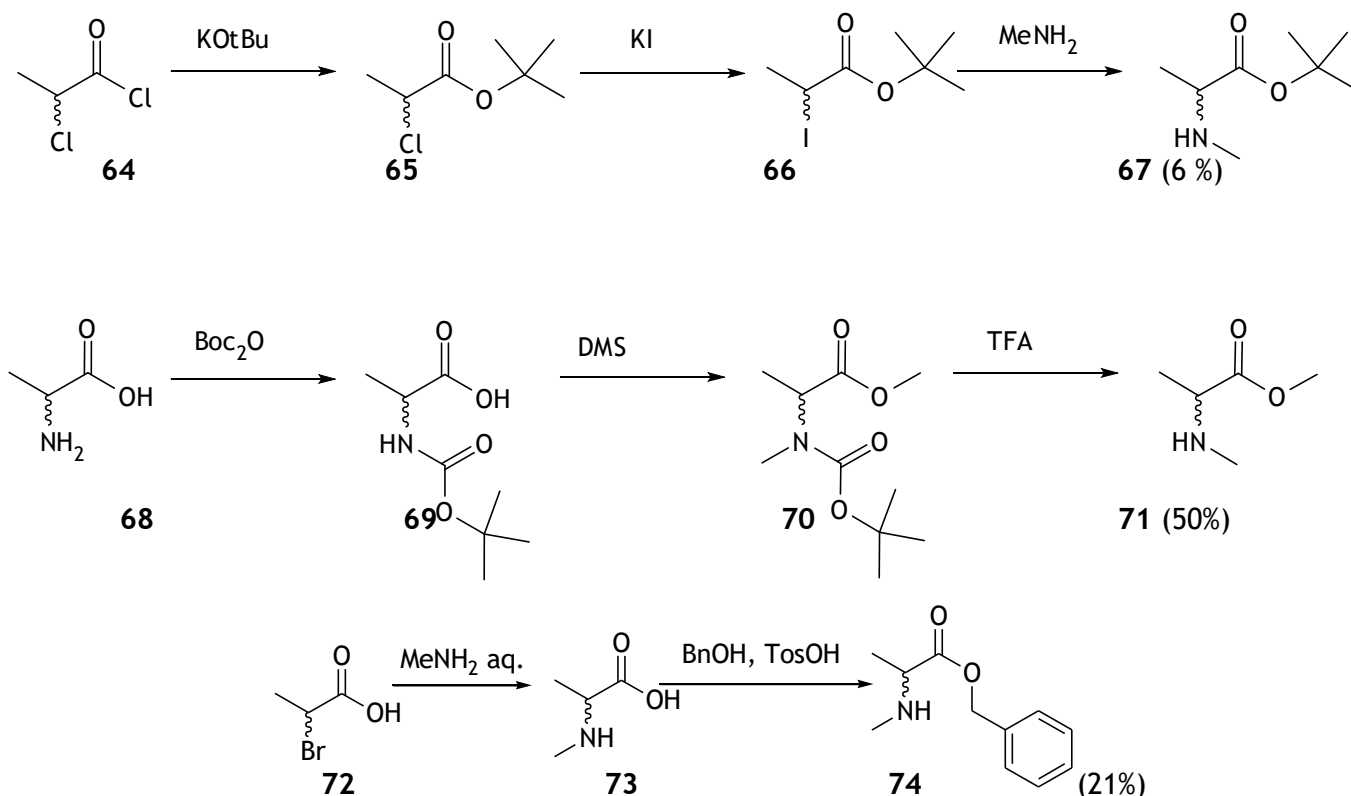


Abb.29: drei unterschiedliche Synthesemethoden für N-Methylalaninester und deren Ausbeute von billigen Edukten aus

Die Dominosynthese (Abb.30) lieferte für den *tert*Butyl- **75** und den Benzylester **76** gute Ausbeuten, wie für stabile aliphatische Aminosäuren üblich. Die geringere Ausbeute für den Methylester kann durch die hier angewendete Reaktionsvariante mit Benzoessäure zurückgeführt werden, da Methanol leichter eliminiert, als Benzylalkohol. Das entstehende Bisacylylid vom Alaninderivat ist so polar, dass es vom Kieselgel nicht eluiert werden kann und deshalb nicht auffiel. Von **75** wurden allerdings nur 65 % Reinprodukt erhalten und der Rest als Mischfraktion mit Triphenylphosphinoxid, welches dann auskristallisierte und entfernt werden konnte, sodass die Mischfraktion letztendlich nur knapp 10 % Triphenylphosphinoxid enthielt. **77** ist polarer und **76** apolarer als **75** und beide lieferten deshalb nach säulenchromatographischer Reinigung keine Mischfraktion.

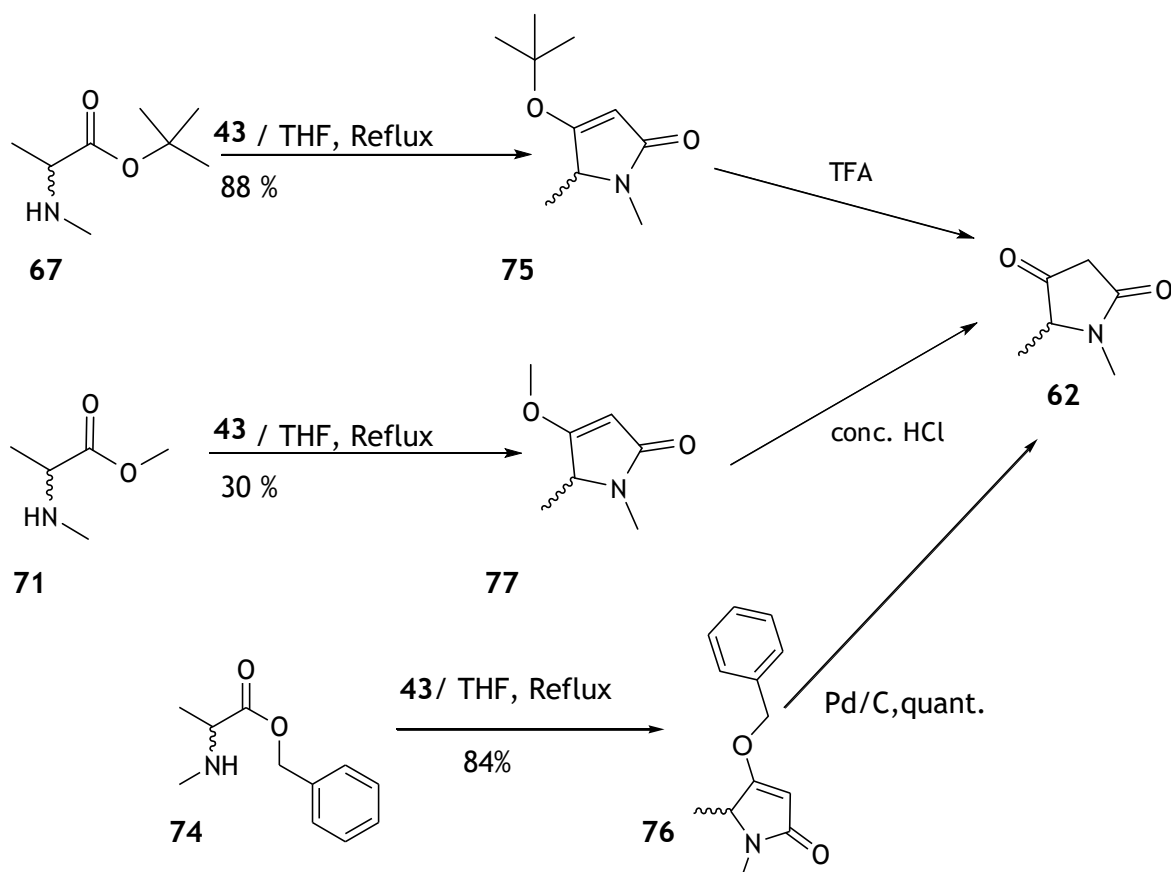


Abb.30: drei Wege für die Synthese des Tetramsäuregrundkörpers **62** für Melophlin C- Derivat **56**, welche beide die Dominosynthese (siehe Abschnitt 2.10.3) mit **43** nutzen

Um für Zelltests auch heteroanaloge Derivate darzustellen, wurde auf ganz ähnlichem Weg 5-Methyl-Thiotetronsäure **78** hergestellt. Dabei entstand jedoch auch immer das cyclische Bisacylylid **79** als Nebenprodukt. Das intermediäre Thioestersterylid (vergl. **83** Abb.32) konnte säulenchromatographisch gut isoliert und wieder eingesetzt werden; dies ist allerdings in der angegebenen Ausbeute bereits mit eingerechnet, weshalb auch nach einer alternativen Lösung gesucht wurde.

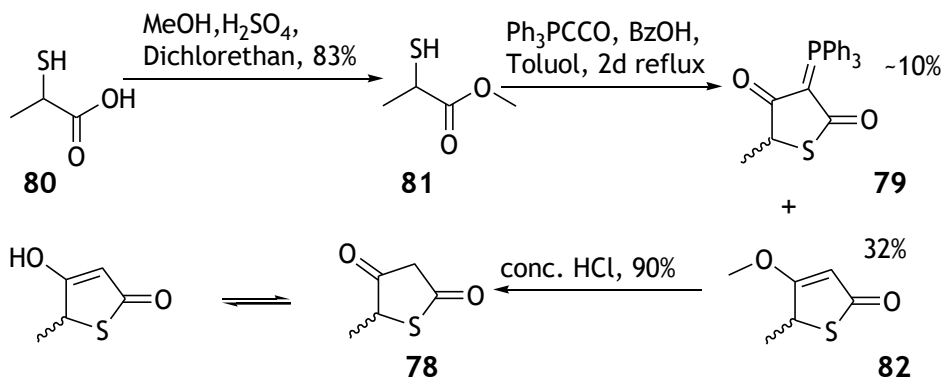


Abb.31: Darstellung von 5-Methylthiotetronsäure **78** über Methylester

Da die Zyklisierung mit dem Alanin-*tert*-Butylester **67** in besserer Ausbeute verlief, als mit dem Methylester **71**, wurde auch der Thiomilchsäure-*tert*-Butylester **84** über ein

Xanthogenat **85** in guten Ausbeuten dargestellt. Die Dominoreaktion jedoch lief überhaupt nur unter sehr hohen Temperaturen ab. Selbst nach mehreren Tagen Kochen in Toluol bildete sich nur das Thioesterylid **83**. Auch Versuche der Reaktion mit oder ohne Benzoësäure, im Bombenrohr und der Mikrowelle konnten die schlechten Ausbeuten nicht verbessern. Allerdings entstand hier kein Bisacylylid.

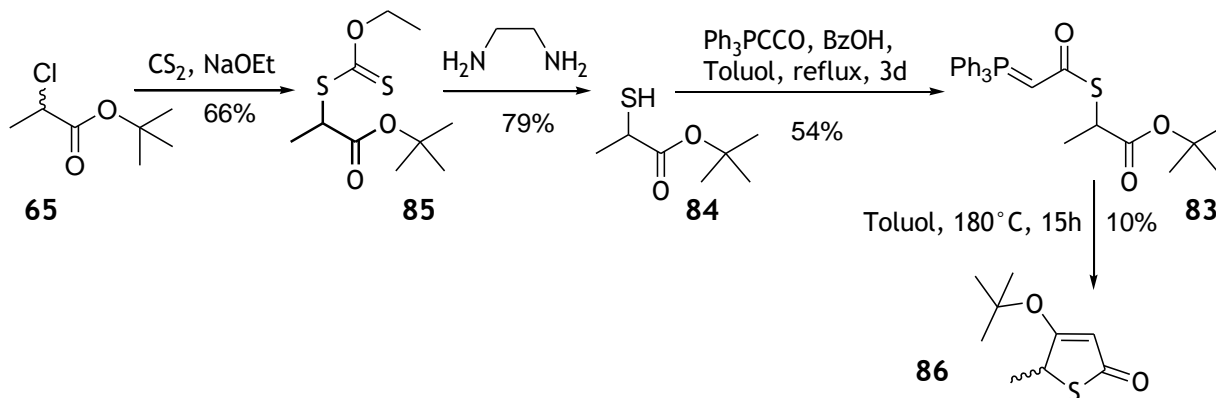


Abb.32: Darstellung von 5-Methylthiotetronsäure **78** über tertButylester

3.1.2 Synthese von 3-Acyltetramsäuren mit Aminofunktionalisierter

Seitenkette

Die Jones-Acylierung von **62** führte nach 45 min Reaktion in der Mikrowelle bei 100°C zum BF₂-Komplex **61** (Abb.27).

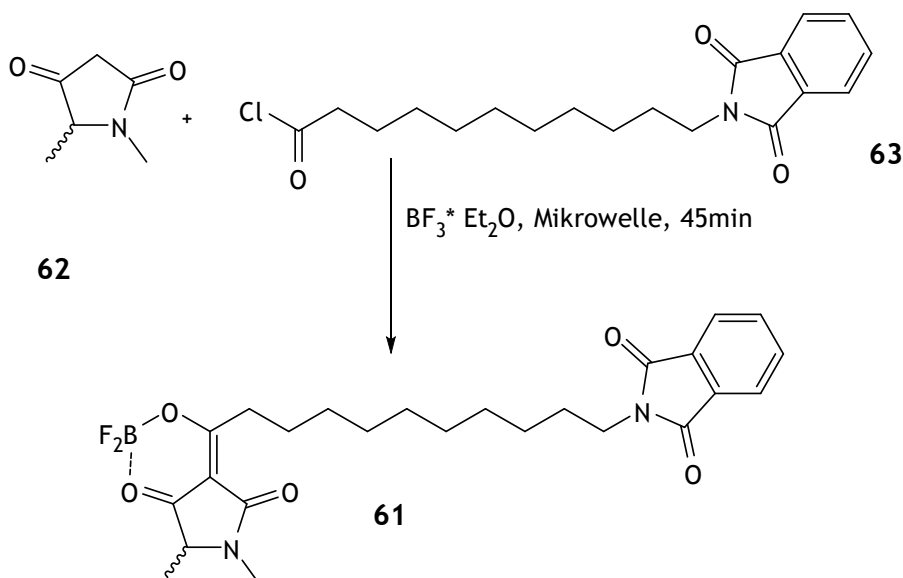


Abb.33: Jones-Acylierung von **62**

Im nächsten Schritt muss die Aminogruppe wieder entschützt werden. Die Hydrazinolyse mit äquimolarer Menge Hydrazin bei Raumtemperatur ließ das Molekül jedoch vollkommen unangetastet. Nach sechs Stunden Erhitzen von **61** in DMF mit 3 Äq. Hydrazinacetat bei 80°C, zeigte die dünnschichtchromatographische Untersuchung dann das vollständige

Chemical reaction scheme showing the synthesis of compound **90** from compound **87**.

Compound **87** (a 1,2,4-triazole derivative with a long alkyl chain ending in an amine group) reacts with compound **88** (a complex polycyclic aromatic compound with a carboxylic acid group).

Reaction conditions: $\text{Ät}_2\text{O} / \text{H}_2\text{O} / \text{Aceton}$, HCl (pH3), 45°C , 6h.

The reaction proceeds via an intermediate (labeled **89**) to form compound **90** (a 1,2,4-triazole derivative with a long alkyl chain ending in a thioamide group).

Also wurde Hydrazon **87** direkt an Fluorescein-Isothiocyanat **88** zum Thioharnstoff **89** addiert und anschließend sauer hydrolysiert (Abb.34). Es wurden vier fluoreszierende

Fraktionen auf präparativer Dünnschichtchromatografie getrennt, die aber im ^1H - NMR-Spektrum nicht eindeutig und sauber als **90** identifiziert werden konnten.

Um die Entschützung zu erleichtern, wurde das Boc-geschützte Derivat **92** dargestellt und nach Yoda³⁹ an **62** acyliert. Entschützung im Säuren und Evaporieren lieferte **93**. Alternativ wurde **92** mit Ethylchloroformiat aktiviert⁴⁰ und so selektiv mit Borohydrid zum Alkohol **94** reduziert. Nach Standardoxydation mit PCC⁴¹ erhielt ich Aldehyd **95**, der mit Ylid **96** zu **97** reagierte.

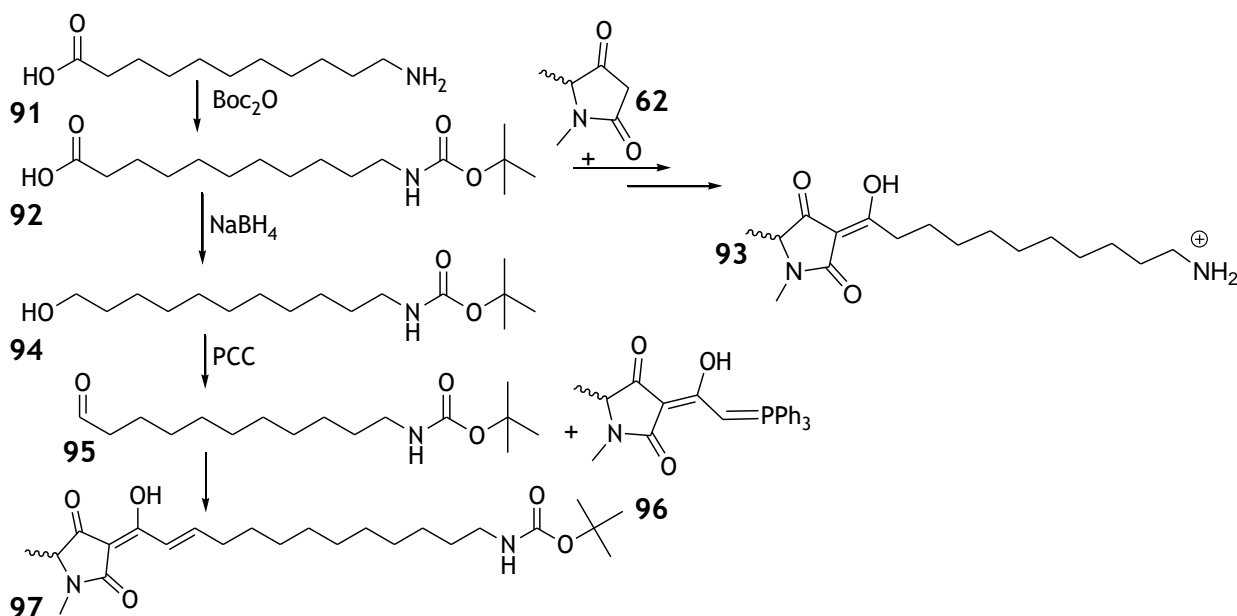


Abb. 35: zwei alternative Synthesen für 3-Acyl-Tetramsäuren mit aminoterminierter Seitenkette

Das entscheidende Problem ist aber die hohe Polarität der entstehenden zwitterionischen Aminoacyl-Tetramsäure **93**. Sowohl die Isolierung, als auch die Reinigung sind problematisch. Weiterhin ist die Reaktivität des endständigen Amines herabgesetzt, weil diese hochpolare Verbindung überhaupt nur in polaren Lösungsmitteln löslich ist, dort aber gleichzeitig die aliphatische Kette mangels Solvatisierung zu Rückfaltung neigt. Trotzdem wurde versucht, **93** mit **88** umzusetzen. Es konnten danach mehrere fluoreszierende Fraktionen mittels präparativer HPLC getrennt werden, welche allerdings so wenig Substanz enthielten, dass selbst im ^1H - NMR- Spektrum außer Lösungsmitteln keine Signale erkennbar waren. Da **88** sehr teuer ist und der große apolare Farbstoff die Struktur und damit wahrscheinlich auch die pharmakologischen Eigenschaften stark verändert, wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt.

3.1.3 Synthese verschiedener terminaler Alkine für Klick- Markierung

Dann habe ich als nächstes eine oben bereits angesprochene alkinterminierte Seiten-kette dargestellt⁴² (Abb.36). Dabei zeigte sich, dass die geplanten Reaktionen alle in guter Ausbeute abliefen, wobei die Intermediate leicht zu reinigen waren.

Ausgehend von den billigen Hexandiol **98a** und Dodecandiol **98b** wurde jeweils monobromiert⁴³ und THP- geschützt. Das Alkin wurde als leicht handhabbarer Lithium-acetylid-Ethylendiaminkomplex in sehr guten Ausbeuten eingeführt. Nach der Frei-setzung des Alkoholes **102** wurde dieser für die 3-Acylierung von Tetram- und Thiotetronsäuren zur Säure⁴⁴ **103** oder für die Wittigreaktion mit den entsprechenden 3-Acyl-Yliden zum Aldehyd **104** oxydiert. Für die HWE- Reaktion (Abb.37) wurden die Alkine problemlos TMS- geschützt⁴⁵. Die Desilylierung der fertigen 3-Acyltetramsäure verlief schnell und einfach mit TBAF; in der analytischen HPLC bei den üblichen 70-100% Methanol mit 0.1% Ameisensäure im Wasseranteil fand bereits vollständige Enschtzung während des Laufes statt.

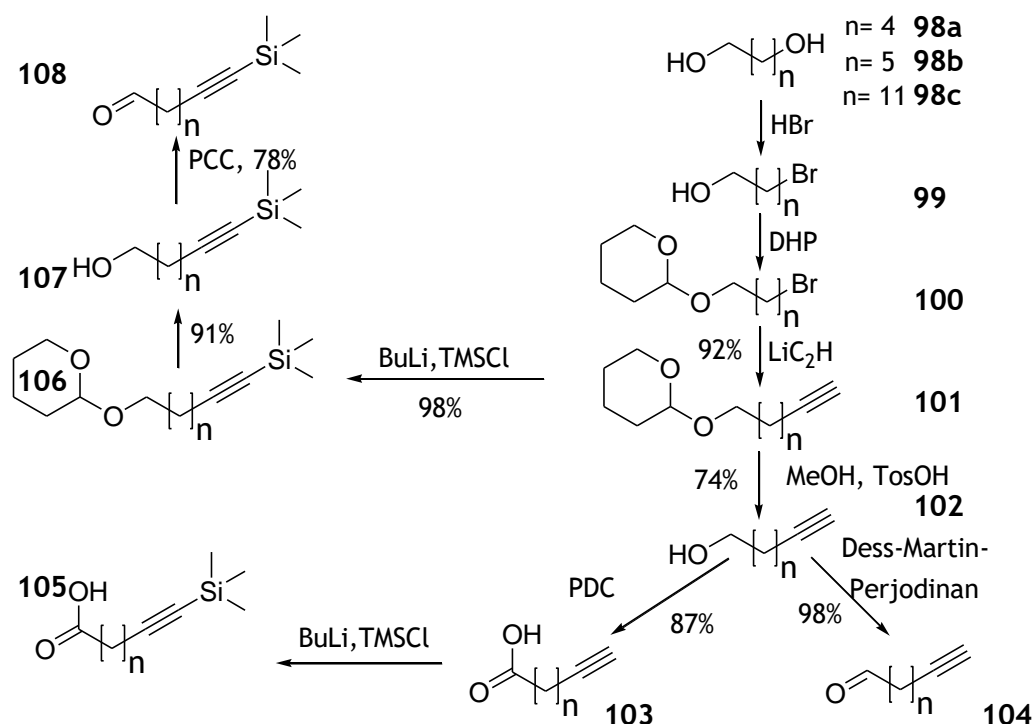


Abb.36: Synthese von diversen Alkin-terminierten aliphatischen Säuren und Aldehyden ausgehend von Pentandiol **98a** Hexandiol **98b** und Dodecandiol **98b**, inklusive TMS- geschützter Alkine

Während der Synthese der Derivate vom Sarcosin stellte sich heraus, dass sich das analoge Acylylid unter verschiedenen Bedingungen weder isolieren, noch mit dem sehr stabilen Anisaldehyd umsetzen ließ. Bei der Synthese von Raveninsäure⁴⁶ hatte Andrea Schlenk aber genau das N-Boc Analog verwendet. Dies ist ein weiteres Beispiel für den großen Unterschied zwischen den N-methylierten und nicht N-methylierten Tetramsäuren. Da ich dennoch das entsprechende α,β - ungesättigte Alkinderivat für den Vergleich mit dem 5-Methyl-Analog

darstellen wollte, griff ich ausnahmsweise einmal auf die Lacey-Dieckmann-Rout⁴⁷ zurück. Auf diese Weise konnte schnell eine große Menge (fast 1g) der Zielverbindung gewonnen werden (Abb.37).

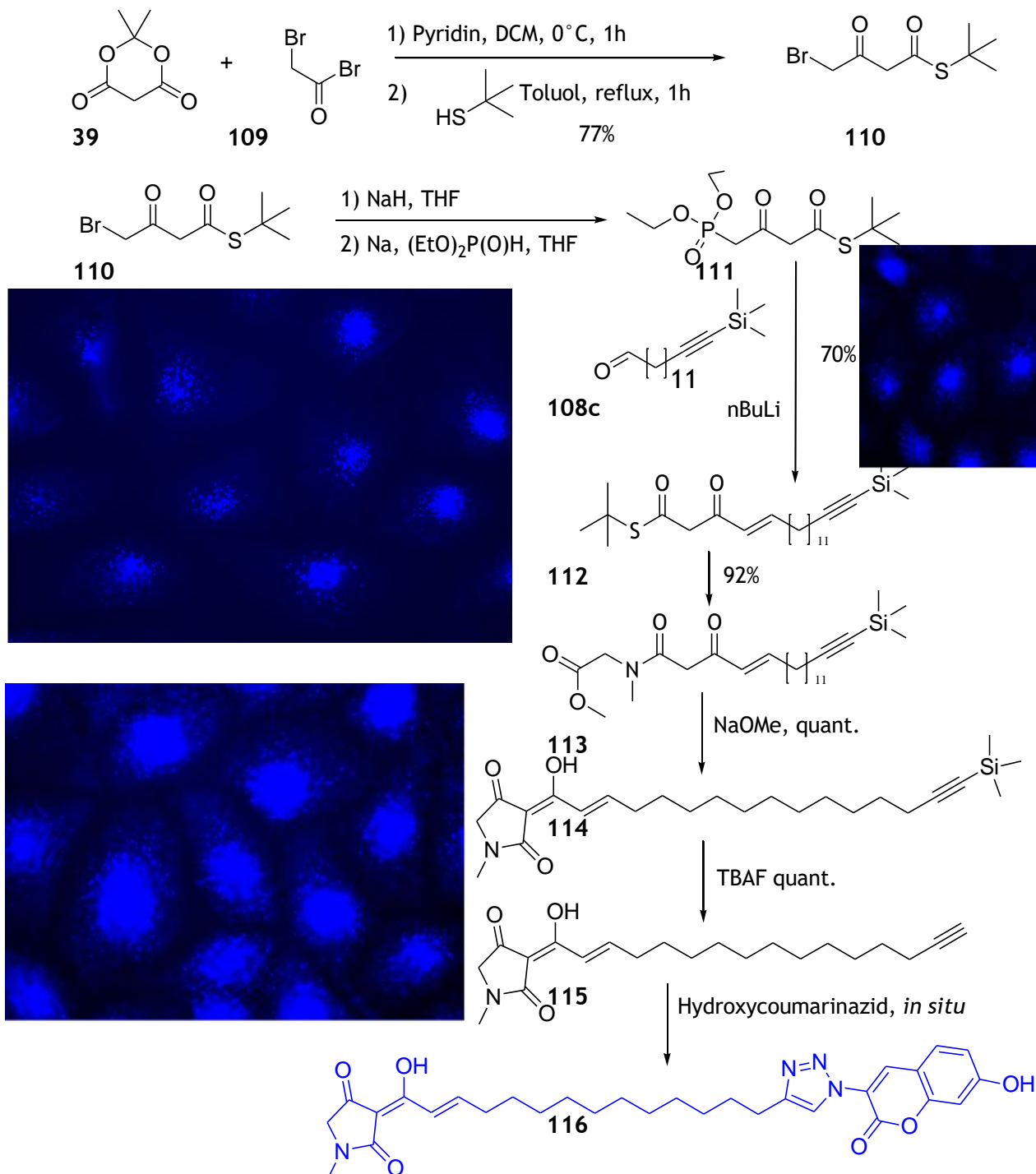


Abb.37: Synthese von alkynterminierter 3-Acyltetramsäure **115** und lichtmikroskopische Aufnahmen von PtK2 -Zellen nach über-Nacht- Inkubation mit **115** (80(unten)- je20(oben) $\mu\text{g/mL}$) und in-situ-Fluoreszenzmarkierung über Klick- Reaktion zu **116**, durchgeführt von Aruna Raja am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung zu Braunschweig.

Nachdem ich nun alle Bausteine fertiggestellt hatte, kombinierte ich diese zu der in Abb. 38 gezeigten Bibliothek. Dafür stellte ich die Tetramsäuren von Phenylalanin und Isoleucin über die Meldrumssäuremethode her und **115** wie oben beschrieben; alle anderen Heterozyklen wurden mit Ylid **43** erhalten.

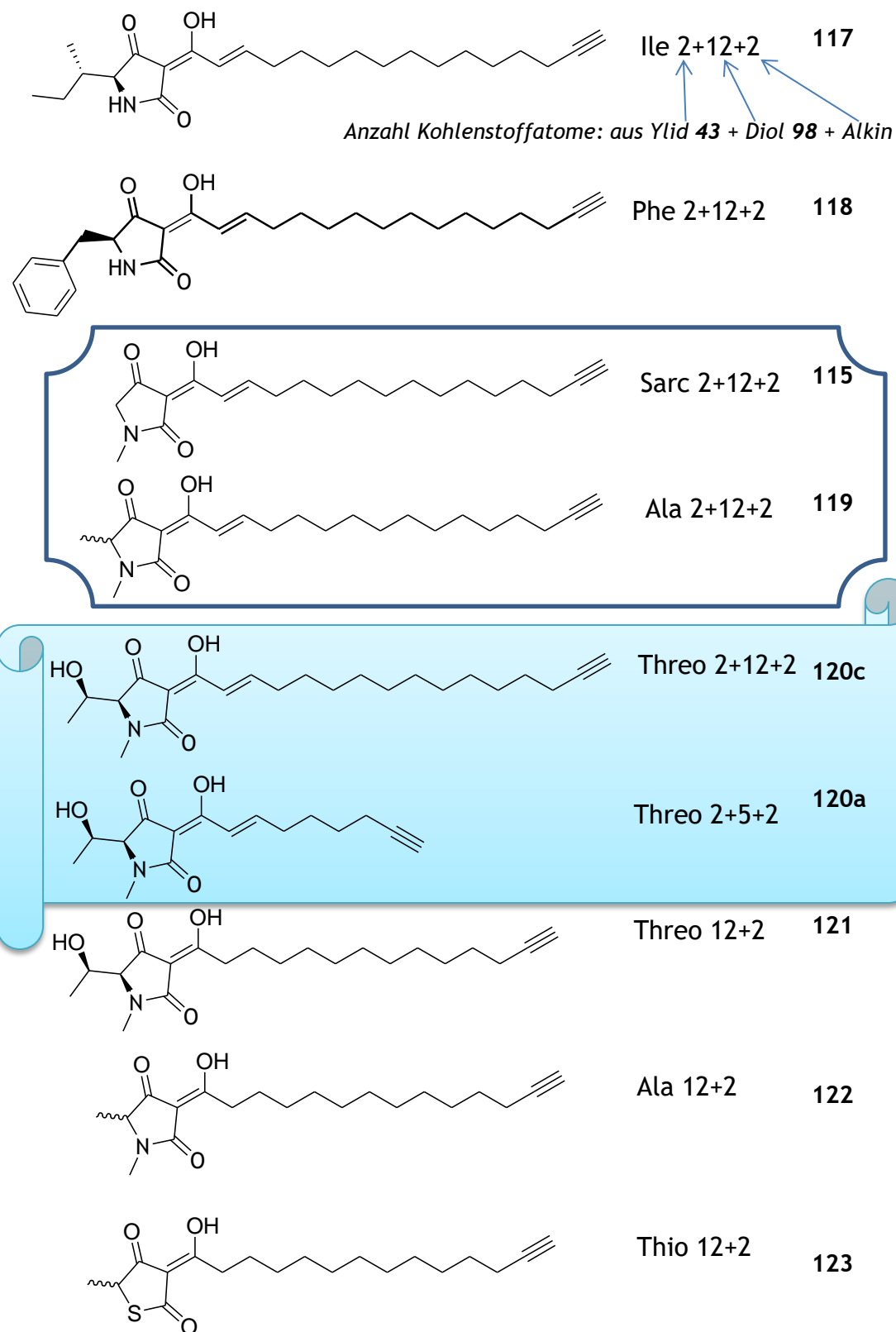


Abb.38: Alkinbibliothek verschiedener Heterozyklen mit unterschiedlich langen Seitenketten.

Katharina Mahal bestimmte von vier der obigen Alkine mittels MTT- Test (siehe Abb.25) zunächst die Zytotoxizität an Hautkrebszellen (Abb.39). Daran erkennt man nicht überraschenderweise, dass die Melophlin- ähnlichen Derivate zytotoxischer wirken, als die Penicillenol- ähnlichen. Natürlich wirken Substanzen mit langer hydrophober Seitenkette allein schon durch ihre Eigenschaft toxisch, mit der Seitenkette in Membranen zu „interkalieren“ und somit diese zu destabilisieren. Ein solcher Effekt ist aber für Therapeutika unerwünscht, da er nicht zwischen gesunden und Krebszellen diskriminiert. Weiterhin wirkt das apolare Alaninderivat **119** besser, als die polareren Derivate von Sarcosin **115** und Threonin **120**.

IC ₅₀ (µM, 72 h) an 518A2-Melanomzellen			
115	119	120c	120a
24,4 ± 1,7	19,2 ± 1,5	30,0 ± 8,9	117,9 ± 2,7

Abb.39: IC₅₀- Werte von 115, 119, 120c und 120a an 518A2- Zellen

Außerdem untersuchte Katharina Mahal die Verbindungen auf Unterschiede in durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen, als auch Fluoreszenzfärbungen mittels Hydroxycoumarinazid (Abb. 40,41).

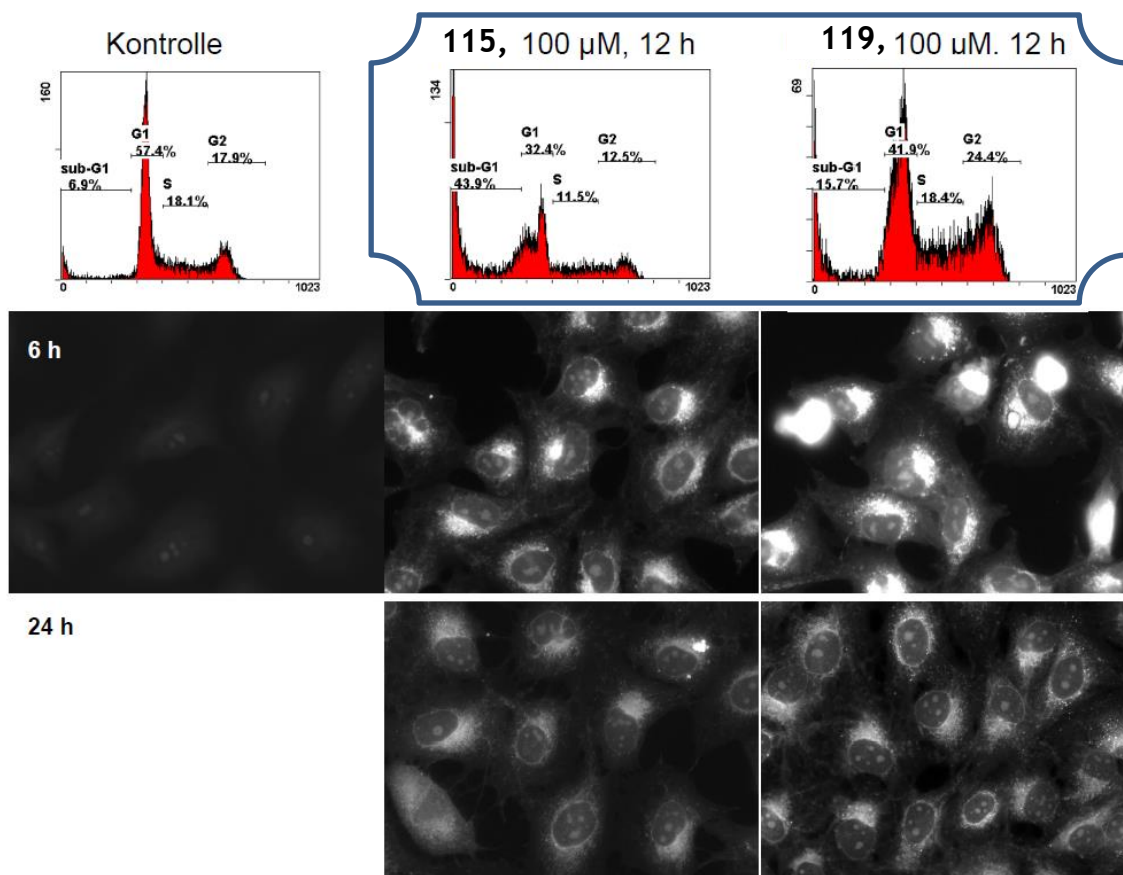


Abb.40: Zellzyklusanalysen der Melophlinanaloga **115**/ **119** und lichtmikroskopische Aufnahmen mit **115**/ **119** behandelter Zellen, markiert mit Hydroxycoumarinazid

Unterscheiden sich zwar **115/ 119** kaum in ihrer zellulären Verteilung und hinsichtlich der Beeinflussung des Zellzyklus, fällt deutlich der G2- Arrest der mit Penicillenol- derivat **120a** behandelten Zellen ins Auge (Abb.41). Interessanterweise zeigen die mikroskopischen Aufnahmen genauso auffallend die Verteilung des langkettigeren **120c** in granulösen Strukturen außerhalb des Zellkerns. Hierbei könnte es sich um den Golgi- Apparat, oder das endoplasmatische Reticulum handeln, was mittels Kolokalisation mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu beweisen wäre. Im Kontrast dazu färbt das kurzkettigere **120a** die Zellkerne und insbesondere die Nucleoli; die Beeinflussung von Strukturen, die im Kern für die Organisation der Chromosomen zuständig sind, könnte das Eintreten in die Mitose verhindern und somit den G2- Arrest verursachen.

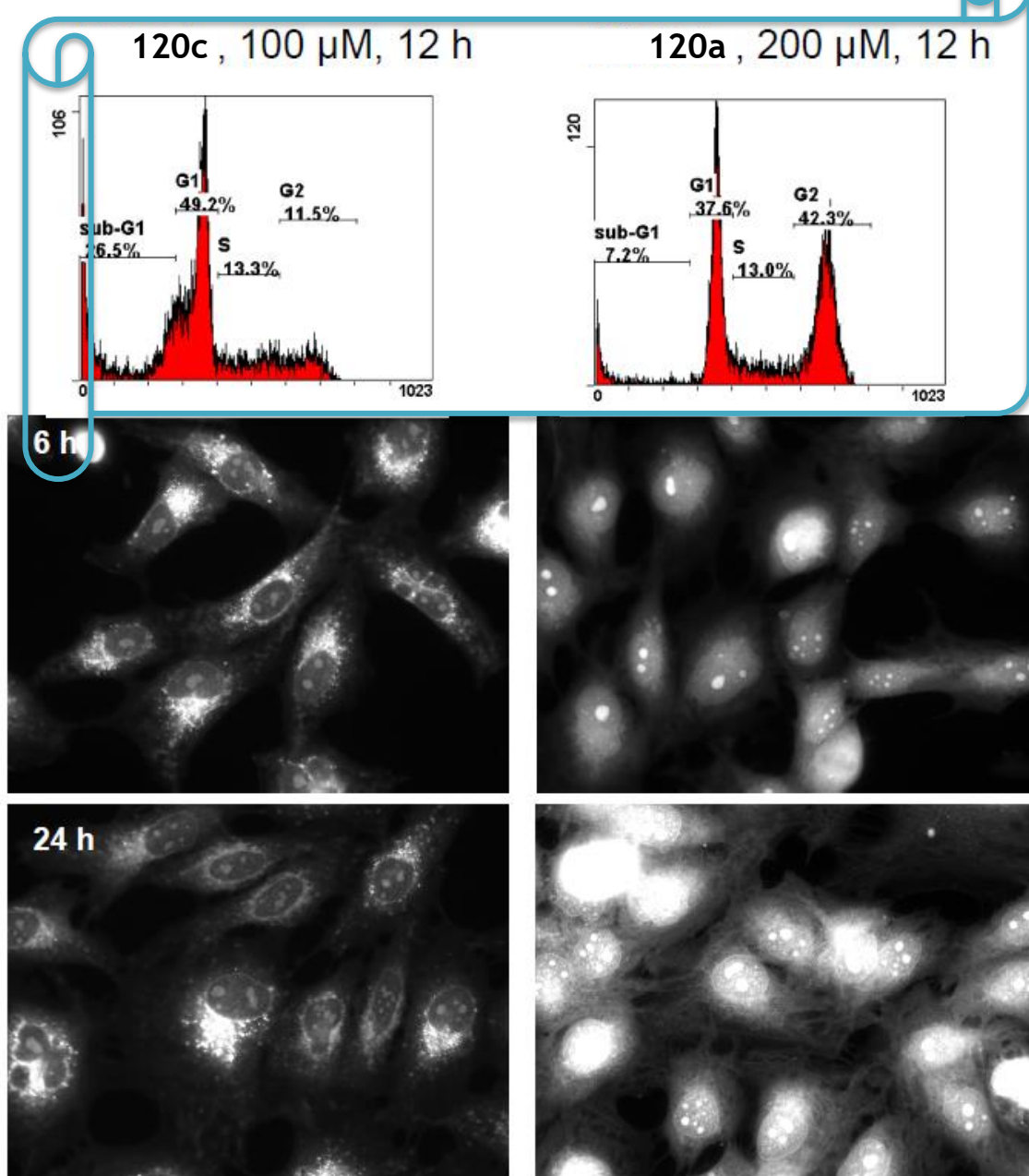


Abb.41: Zellzyklusanalysen der Penicillenolanaloga **120a/c** und lichtmikroskopische Aufnahmen mit **120a/c** behandelter Zellen, markiert mit Hydroxycoumarinazid

Versuche zur Koloalisation Alkin- markierter 3-Acyltetram-säuren mit spezifischen Antikörpern

Sebastian Schrüfer, Verena Fetz, Karl Kempf, Rainer Schobert; *Publikation in Vorbereitung*
Koloalisation mit dsRED-fusionierten Proteinen

Hierfür habe ich die Alkynyl- Tetramsäuren von der Idee der Markierungsmethode bis zur Synthese und Isolierung hergestellt. An der biochemischen Anwendung habe ich nicht mitgewirkt.

Durchführung: alle Volumina 200 μL , wenn nicht anders angegeben

-KB 1.3-Zellen in „Chamberslides 15 μ slides 8 well“ aussähen, 200 μL Volumen, Zelldichte $0,06 \cdot 10^6$ Zellen/mL

-nach ca. 24 h Plasmid-Transfektion mit Jet-Prime-Transfection-Kit (30 μL Puffer, 0,3 μg Plasmid-DNA, 0,6 μL Transfektionsreagenz; Portionsweise Zugabe über die gesamte Fläche des *well(s)*)

-nach etwa 16 h erfolgte Zugabe der Tetramsäuren mit einer finalen Konzentration von 100 μM , Inkubationszeit 6 h,

-Zellen einmal mit PBS gewaschen und 15 min mit 4% Formaldehyd in PBS fixiert

-Blockieren (1% BSA, 0,1% Triton X100 in PBS) für 20 min

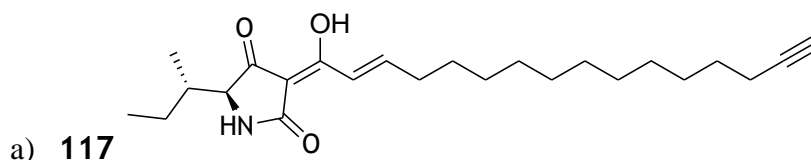
-Zugabe des Click-Mastermix:

40 μL CuSO_4 (100 mM)
100 μL Na-Ascorbat (100 mM, frisch)
20 μL Hydroxy-Coumarin (10 mM)
1840 μL 1% BSA in PBS

2 h im Dunkeln bei RT inkubiert

-Blockieren für 5 min mit 1% BSA in PBS und anschließend mit PBS überschichtet bis zur Mikroskopie

Ergebnisse:



ER = endoplasmatisches Retikulum, Mito = Mitochondrium

Das Fluoreszenzsignal der Tetramsäure **117** koloalisierte teilweise mit fluoreszenzmarkierten ER- als auch Mitochondrien-Markerproteinen. Da kein eindeutiger

Unterschied in der Überlagerung mit ER oder Mitochondrien Signalen detektiert werden konnte, kann die intrazelluläre Lokalisation von **117** nicht eindeutig definiert werden. Das Einfügen einer Photoaffinitätsgruppe könnte eine genauere Lokalisierung der Tetramsäure innerhalb der Zelle ermöglichen.

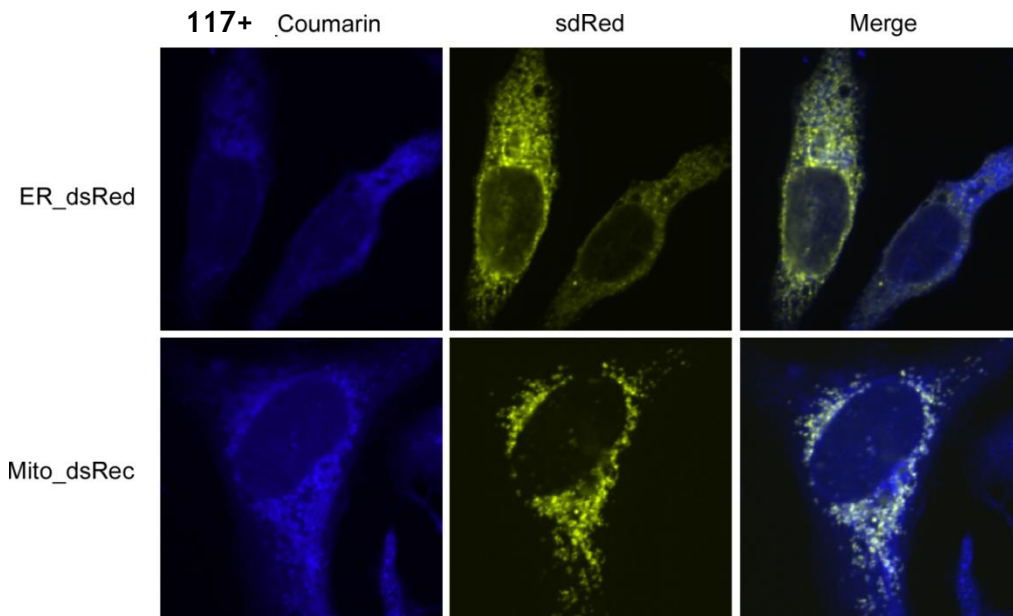


Abbildung 1: Transfektion der KB 1-3-Zellen mit ER-dsRED und Mito-dsRED, anschließende Inkubation mit **117** und Click-Reaktion. Einzelfärbungen und Überlagerung der Einzelfärbungen

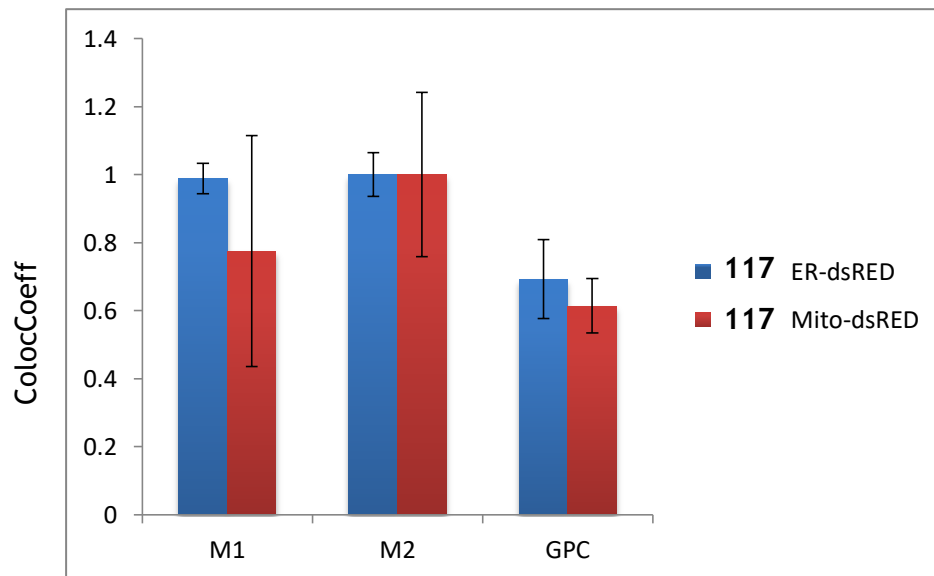
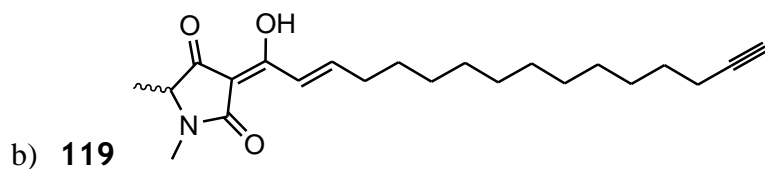


Abbildung 2: Bestimmung des Colokalisations-Koeffizienten ER-dsRED und Coumarin bzw. Mito-dsRED und Coumarin. M1/2 = Manders coefficient Channel 1/2, GPC = Pearson's correlation coefficient.



Für die Tetramsäure **119** zeigte sich ein ähnliches Bild wie für Verbindung **117**. Auch hier konnte keine eindeutige Colokalisation der Verbindung im ER oder den Mitochondrien nachgewiesen werden (Abb. 3 und 4).

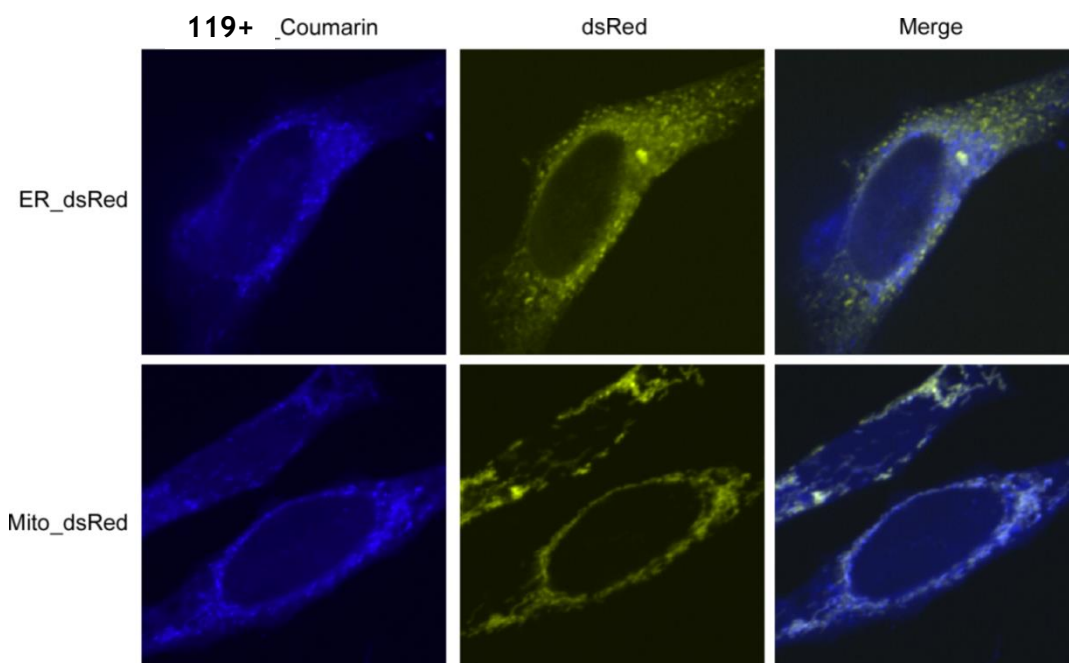


Abbildung 3: Transfektion der KB 1-3-Zellen mit ER-dsRED und Mito-dsRed, anschließende Inkubation mit **119** und Click-Reaktion. Einzelfärbungen und Überlagerung der Einzelfärbungen

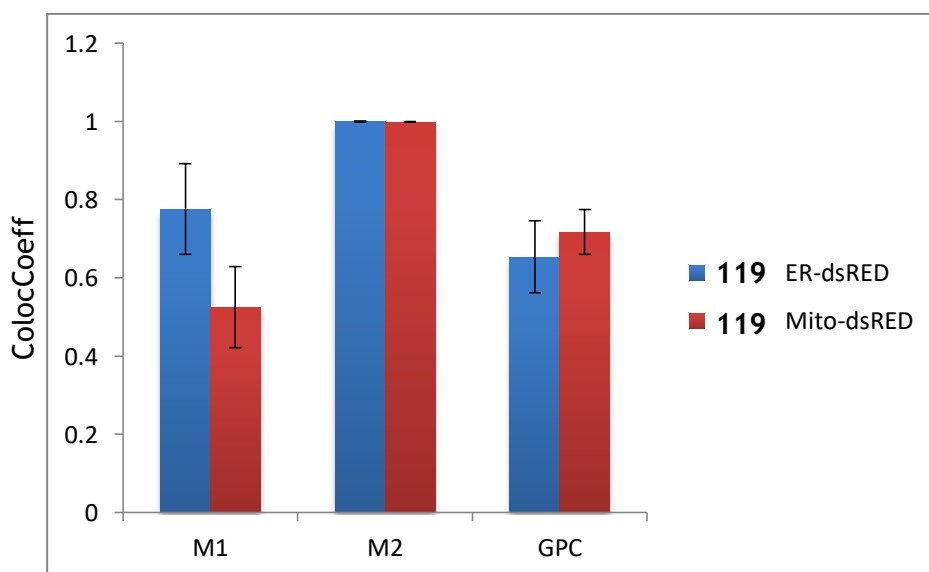


Abbildung 4: Bestimmung des Colokalisations-Koeffizienten ER-dsRED und Coumarin bzw. Mito-dsRED und Coumarin

3.1.4 Synthese von Bisazidderivaten für Photoaffinitätsmarkierung und Isolierung der Zielproteine

Zunächst versuchte ich, analog zur Synthese von Photovastatin⁴⁸, die Bisazideinheit über den Benzylalkohol **124** mit einer Seitenkette zu verethern.

Der nach Literaturvorschrift erhaltene **124** reagierte nicht mit kommerziell erhältlicher 10-Bromo-decansäure **125**.

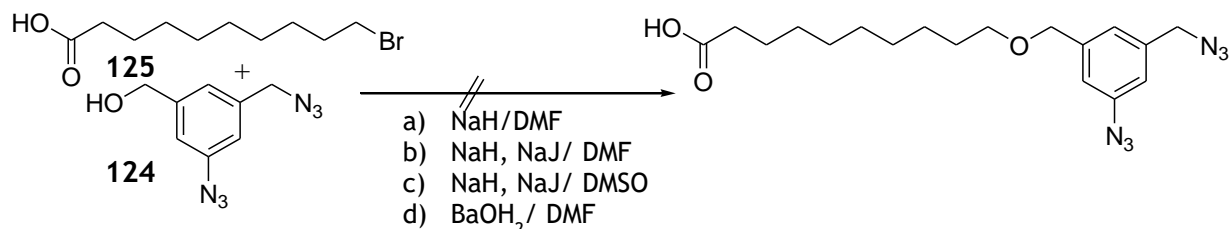


Abb.42: fehlgeschlagene Veretherung mit Alkylbromid

Tabelle 1: **124** reagierte unter folgenden Bedingungen auch nicht mit dem analogen 10-Bromodecansäuremethylester.

	Base	Katalysator	Kronenether	LM
A	NaH	KJ	-	DMSO
B	NaH	KJ	15[5]	THF
C	NaH	KJ	15[5]	DMF
D	KH	KJ	18[6]	THF
E	KH	TBAI	-	THF
F	LiHMDS	TBAI	-	THF

Kurioserweise wurde das Tosylchlorid laut DC noch vor vollständigem Umsatz mit **124** rückgebildet, weshalb mit dem 8-Hydroxyoctansäureethylester **126** ebenfalls keine Veretherung erfolgte.

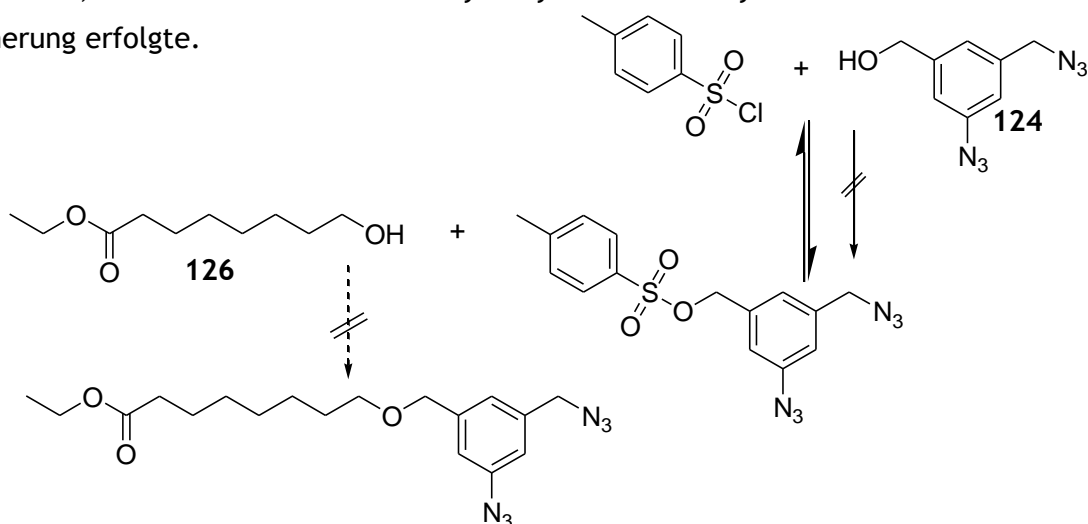


Abb.43: fehlgeschlagene Veretherung mit Tosylchlorid

Das bei der Synthese als Nebenprodukt erhaltene Azidobenzylbromid **127** war so inert, dass es nicht einmal nach tagelangem Kochen in THF Zersetzung zeigte, geschweige denn Veretherung.

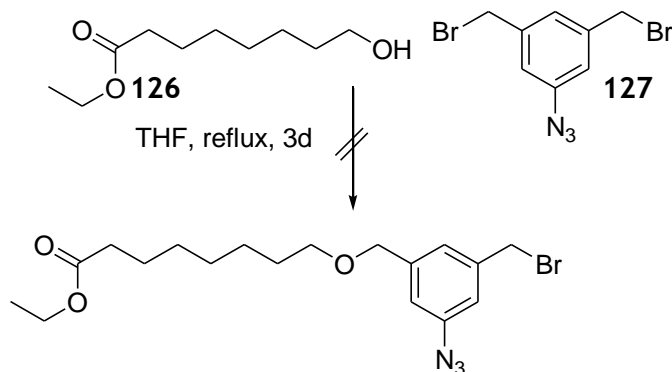


Abb.44: fehlgeschlagene Veretherung mit Benzylbromid

Nach so vielen Fehlversuchen verlief jedoch die Route zur analogen funktionalisierten Benzoësäure völlig problemlos. Die Amidbildung aus derselben und dem 11-Amino-undecansäuremethylester mit T_3P überraschte sogar mit quantitativer Ausbeute und konnte somit publiziert werden (Abschnitt 4.3).

Nach derselben Methode habe ich dann noch zwei weitere Bisazidderivate dargestellt, welche von Katharina Mahal und Philipp Kahlen verwendet wurden, um die daran gebundenen Proteine isolieren zu können. Als Vortest konnte Katharina mittels Streptavidin-funktionalisierter Festphase die Bindung von BSA aus einer konzentrierten Lösung (1mg/mL) an diese Bisazide nach Photo-aktivierung und anschließender Staudinger- Ligation mit Biotin-Phosphin bestätigen.

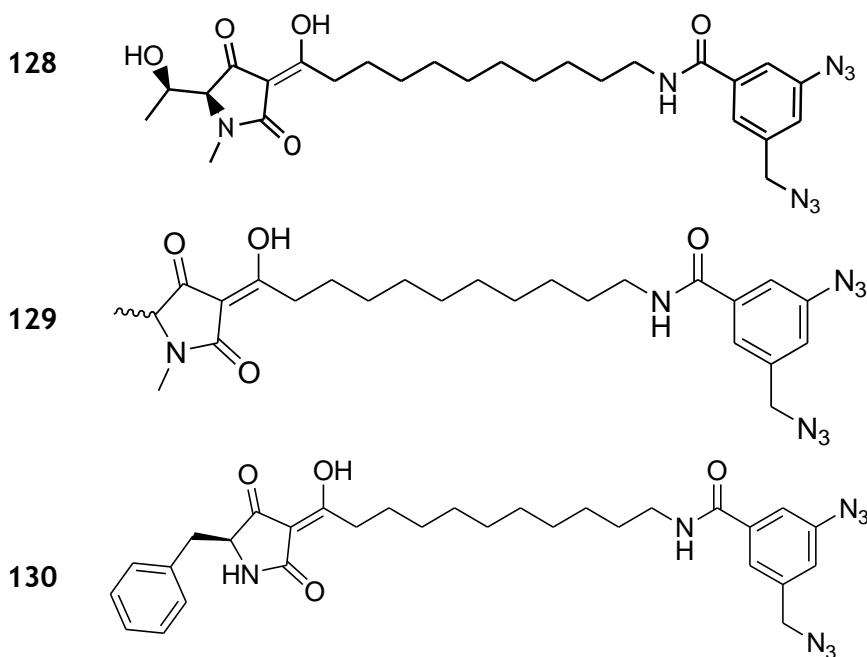


Abb.45: von mir dargestellte Bisazid- markierte Tetramsäurederivate

Die drei Derivate (**128- 130**) in einer Lösung aus Zelllysats wurden nach Belichtung mit 150 W mittels einer Staudinger- Ligation an ein Biotin- Phoshin **131** gebunden.

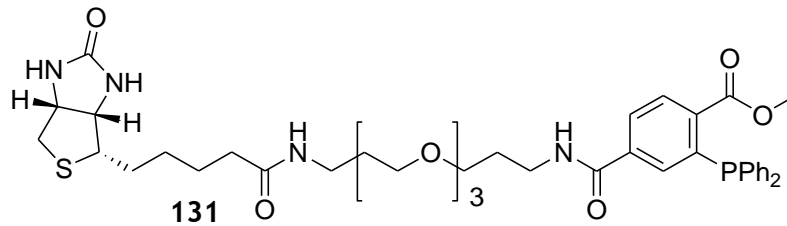


Abb. 46: kommerziell von ThermoScientific erhältliches „EZ-Link® Phosphine-PEG₃-Biotin“

Nach einer Affinitätsaufreinigung mit magnetischen Streptavidin- Perlen lieferte das **erste Gel** keine sichtbaren Banden. Dies lag wahrscheinlich daran, dass vergessen wurde, den Wasserkühlmantel der Lampe zu entfernen. Dieser ist zwar unerlässlich, um bei längeren Reaktionen ein Überhitzen der Lampe zu verhindern, aber drei bis fünf Minuten sind auch ohne möglich. Meine Vorversuche zur Photoaktivierung des Bisazids hatten nämlich gezeigt, dass jene Glasschicht wohl das Licht niedriger UV- Wellenlängen herausfiltert, welches für diese Photoreaktion unerlässlich ist.

Bei dem **zweiten Versuch** wurden die Perlen weniger oft gewaschen, was dazu führte, dass auf dem Gel überall die Banden des Zelllysates zu sehen waren.

Außerdem mussten die Proben über Dialyse bzw. Mikro-Säulen vom Überschuss an Biotin-Phosphin befreit werden.

Weiterhin war nicht auszuschließen, dass das Zielprotein ein (mitochondriales) Membranprotein ist, welches durch die Zentrifugation des Zelllysats vor dem Experiment abgetrennt wurde.

Beim **dritten Versuch** wurden folgende Veränderungen vorgenommen:

- Vorabsättigung der Festphasenperlen mit Biotin- Phosphin, wodurch der Überschuss sofort abgetrennt wird und eine Dialyse entfällt
- Lyse zusätzlich zum TritonX-Detergens mit mechanischem Homogenisator, um Membranproteine besser in Lösung zu überführen
- Schwächere Zentrifugation (300g), um auch schwerere Protein(komplexe) im Experiment zu behalten
- Stringenteres Waschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen

Leider war zu diesem Zeitpunkt noch kein Kontakt zu einer massenspektrometrischen Untersuchung hergestellt worden, weshalb dieses Gel verworfen und die restlichen Proben (weil nur ein Teil der Lösung aufgetragen wurde) eingefroren wurden. Als dann einige Monate später letztere Proben am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle erneut gelchromatographisch untersucht wurden, zeigten sich keine spezifischen Banden. Obwohl

die Proteine vollständig denaturiert und so relativ stabilisiert gelagert wurden, kann es zur Zerstörung gekommen sein.

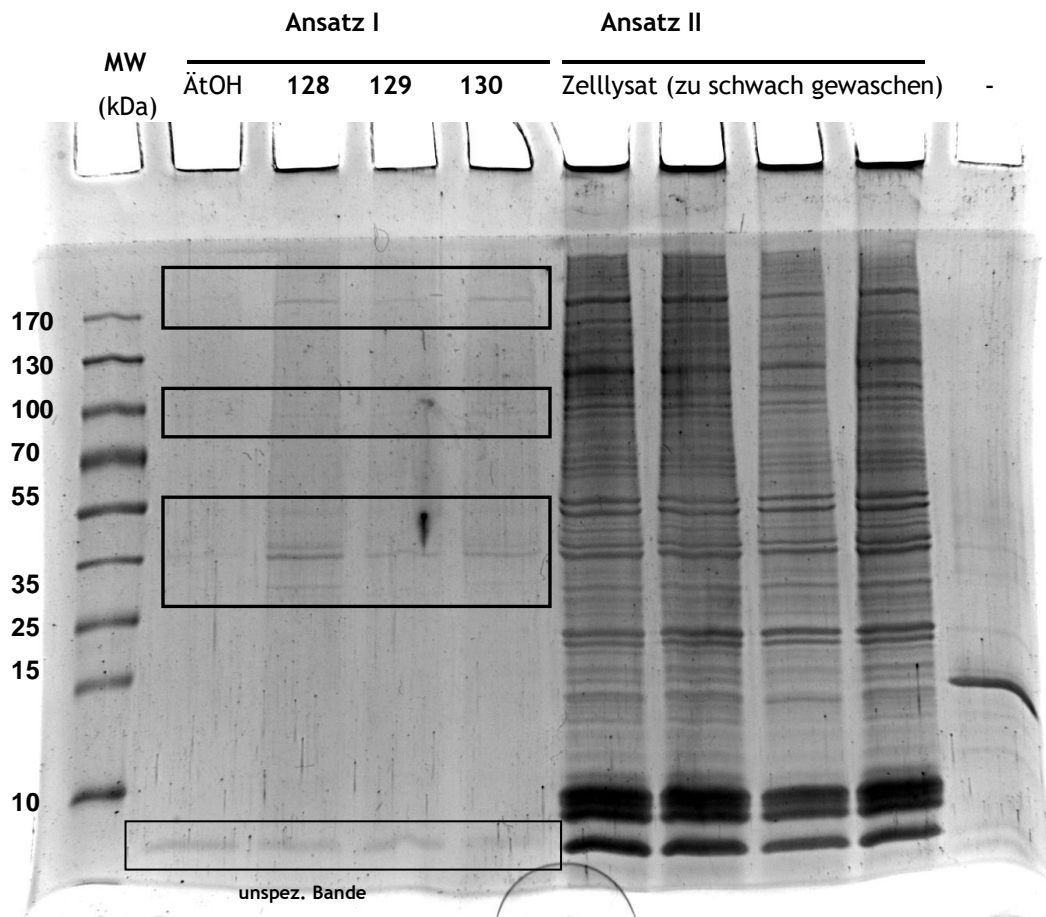


Abb. 47: das SDS- Polyacrylamid-Gel des dritten Versuchs. Man erkennt in den drei Proben der Bisazid- Tetramsäuren (128- 130) mehrere Proteinbanden, die in der Negativkontrolle nicht vorkommen. Die unspezifische Bande als „Ladekontrolle“ ist jedoch zu sehen. Bei Ansatz II wurde ein Wasch-Schritt vergessen, weshalb zu viele unspezifische Banden zu sehen sind.

Beim vierten Versuch, der analog zum dritten durchgeführt wurde, konnten obige Ergebnisse leider nicht reproduziert werden. Hier wiesen alle fünf Spuren dasselbe Bandenmuster auf: die Negativkontrollen ohne Biotin-Phosphin bzw. ohne Tetramsäure ebenso wie die Eluate von den magnetischen Perlen mit den Bisazidtetramsäuren. Dies kann eine Folge ungenügenden Waschens sein, wenn zu viele unspezifisch gebundene Proteine die geringen Mengen spezifische Zielproteine überdecken. Genau dieser Effekt ist ja auch bei manchen der vorherigen Versuche schon aufgetreten.

Nur ganz unten zwischen 10- 15 kDa könnte man zwei Banden vermuten, welche aber nicht mit denen vom letzten Versuch übereinstimmen.

Beim nächsten Versuch muss also wieder auf stringentes Waschen geachtet werden!

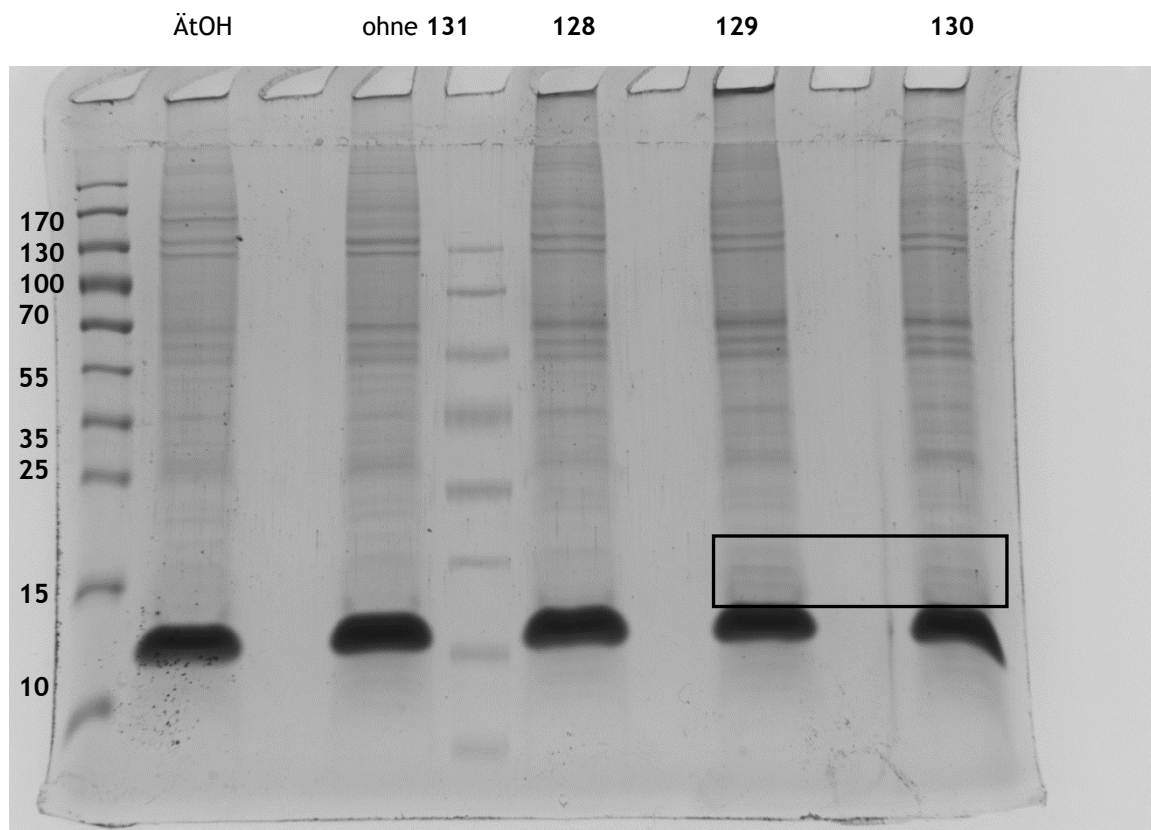


Abb. 48: das SDS- Polyacrylamid-Gel des vierten Versuchs

3.2 3-Acylierung von Tetramsäuren mittels Ketenyliden-triphenylphosphoran und Umsetzung der Ylide mit verschiedenen Oxokomponenten

Prinzipiell existierten bisher nur zwei Arten, eine Tetramsäure an Position 3 zu acylieren. Setzt man die freie Tetramsäure **62** mit einer aktivierten Carbonsäure nach Yoshii⁴⁹ um, erhält man die analoge 4-O-Acyl-Tetramsäure, welche durch eine Fries- ähnliche Verschiebung nach Kochen mit Triethylamin oder nach Zugabe von CaCl_2 ³⁹ in die analoge 3-Acyl-Tetramsäure isomerisiert werden kann (Abb. 49 a). Reagiert **62** in kochendem BF_3 -Etherat mit einem Säurechlorid nach Jones⁵⁰, so entsteht der analoge 3-Acyl-Tetramsäure- BF_2 -Komplex (Abb. 49 b), wobei es am Kohlenstoffatom 5 zur Racemisierung kommen kann. Die 3-Acylierung von Tetramsäuren mit Oligoenoylderivaten nach den obigen beiden Methoden konnte bisher nicht immer erfolgreich durchgeführt werden⁵¹.

Deshalb wurde bei vielen Synthesen ähnlicher Verbindungen auf alternative Wege zur Darstellung von 3-Acyl-Tetramsäuren zurückgegriffen, darunter vor allem die Lacey-Dieckmann-Cyclisierung (Abb. 49 c, siehe Abschnitt 2.10.1). Allerdings stellt dabei ebenfalls die Racemisierung am Kohlenstoffatom 5 durch den notwendigen Einsatz von starken Basen manchmal ein Problem dar.

Ziel des zweiten Aufgabenblockes der vorliegenden Arbeit war es, eine dritte Möglichkeit zu etablieren, eine Tetramsäure an Position 3 zu acylieren (Abb. 49 d). Dazu sollte eine 3-Phosphoranylidentetramsäure **96** hergestellt und diese durch Einsatz geeigneter Basen in einer Wittig-Reaktion umgesetzt werden.

Abb. 49 zeigt im Vorgriff auch meinen Erklärungsversuch, warum die Jones- Acylierung direkt zu 3-Acyl-Tetramsäuren führt und auch mit Ketenylidetriphenylphosphoran **43** selektiv das 3-Acyl- Produkt entsteht, obwohl eine Tetramsäure mit einer aktivierten Carbonylverbindung immer die 4-O-Acyl-Tetramsäure bildet, wobei deren Umlagerung zur 3-Acylverbindung teilweise problematisch ist.

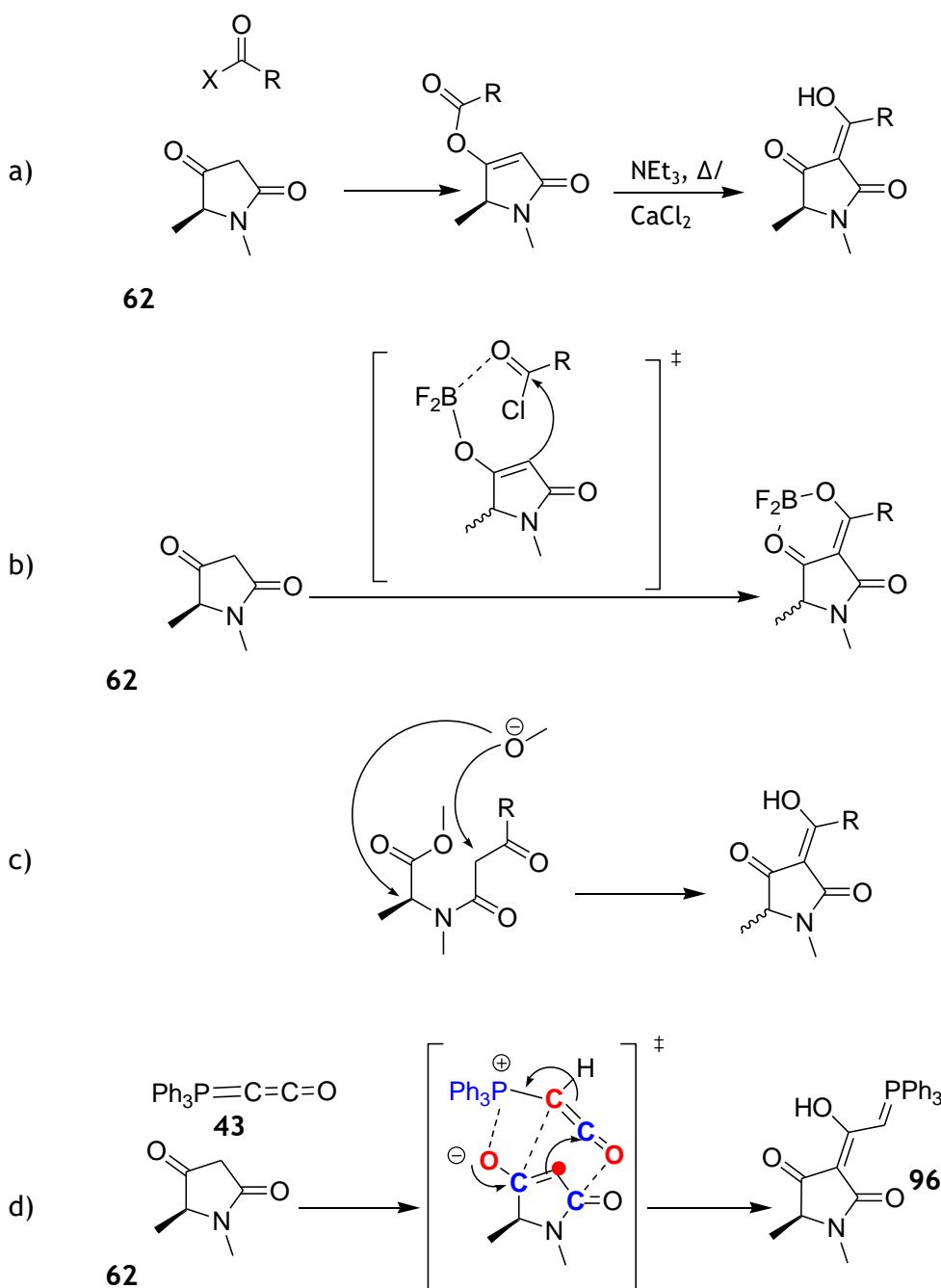


Abb. 49: Übersicht über unterschiedliche Methoden zur Synthese von 3-Acyl-Tetramsäuren

Zunächst ist im Enol der Sauerstoff das bessere beziehungsweise härtere Nukleophil, weshalb alle von mir eingesetzten aktivierten Carbonylverbindungen immer von diesem angegriffen wurden. Während meiner Arbeit habe ich einerseits Säuren mit EDC*HCl bzw. DCC mit katalytischen Mengen DMAP umgesetzt, woraus sich leicht saure Bedingungen ergeben. Andererseits habe ich auch Säurechloride und gemischte Anhydride von Carbonaten und Phosphonaten (T₃P) mit Triethylamin eingesetzt, woraus sich basische Bedingungen ergeben.

Das Besondere an der Jones- Acylierung ist die starke Lewis-Säure BF₃. Yoda hat in seinen Untersuchungen gezeigt, dass CaCl₂ als Lewis- Säure in der Lage ist, die Umlagerung zu katalysieren³⁹. Dabei bestätigten auch meine Reaktionskontrollen mittels HPLC, dass immer zunächst die 4-O- Acyl-Tetramsäure gebildet wird, welche sich dann schneller (α -CH₂) oder langsamer (bei α - Methylsäuren) umlagert. Dabei spielt es kaum eine Rolle, ob die 4-O- Acyl-Tetramsäure zwischendurch aufgereinigt wird, oder ob CaCl₂ in die Acylierungslösung gegeben wird. Daher dachte ich, dass auch BF₃ lediglich die zunächst 4-O- acylierte Verbindung umlagert. Deshalb versuchte ich an einem problematischen Beispiel (siehe Abschnitt 3.3.5), ob dies auch bei isolierter 4-O- Acyl- Verbindung **135** der Fall ist (Abb. 50). Zugabe stöchiometrischer Mengen BF₃- Etherat leiteten keine Reaktion ein, Intensivierung der Bedingungen (Erhitzen) führte zur Zersetzung.

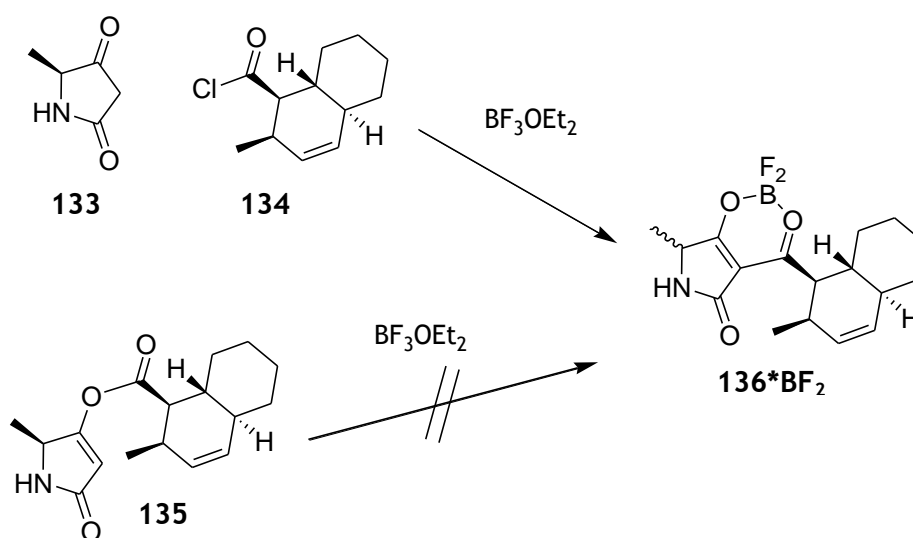


Abb. 50: Synthese von **136** mit Hinweis auf den Mechanismus der Jones- Acylierung

Daraus schließe ich, dass bei der Jones- Acylierung in BF₃- Etherat die Tetramsäure als protische Verbindung als erstes (unter HF- Abspaltung) einen intermolekularen nicht-chelatartigen BF₂- Komplex bildet (siehe Abb. 49). Durch die Oxophilie von Bor „blockiert“ dieses gewissermaßen den Sauerstoff, wodurch nur noch das Kohlenstoffatom als Nucleophil „übrigbleibt“. Da der Elektronenzug die Nucleophilie noch weiter herabsetzt, stimmt das Modell mit den experimentellen Befunden überein, dass eine 4-O- Acylierung normalerweise

bei Raumtemperatur abläuft, wohingegen die HPLC- Kontrolle der Jones- Reaktion gezeigt hat, dass bei 40°C kaum Produkt erscheint; bei 60°C braucht es immer noch 60 min, bis ein ähnlich hoher Umsatz erreicht ist, wie bei 80°C bereits nach 20 min. Alle diese Temperaturen gelten für geschlossene Gefäße, da die Rückflusstemperatur natürlich zu gering ist.

Für die selektive 3-Acylierung von Ketenylidentriphenylphosphan **43** schlage ich folgende Begründung vor: Erstens ist das Carbonylkohlenstoffatom von **43** nicht durch ein Heteroatom als Abgangsgruppe aktiviert, was es nach HSAB „weicher“ macht und somit eher mit dem „weichen“ Kohlenstoffnukleophil des Enols reagiert. Der Reaktionsmechanismus ist im Gegensatz zur Substitution am Carbonylkohlenstoffatom bei der 4-O- Acylierung hier eine Addition. Somit ist in einer zweistufigen Addition, bei der zuerst ein Protonentransfer als Säure- Base- Reaktion stattfindet die „Abgangsgruppe“ lediglich die Doppelbindung, die sich vom Sauerstoff zum Phosphor verschiebt. Dies ist der wahrscheinlichere Mechanismus, da natürlich Säure- Base- Reaktionen sehr schnell ablaufen und zudem für eine konzertierte Addition die Tetramsäure in der Enolform vorliegen müsste, was durch ¹H-NMR- Spektroskopie nachweislich in apolaren Solventien nicht der Fall ist. Zweitens könnte durch die abwechselnde Abfolge von **negativer** (rot dargestellt in Abb. 49) und **positiver** Partialladung eine elektrostatisch kontrollierte Annäherung in der Weise erfolgen, dass ein Angriff des C-3 bevorzugt wird.

Nach Analyse dieser Ergebnisse kam mir die Idee für eine weitere Synthesemethode für Methiosetin (siehe Abschnitt 3.3.5)

3.2.1 3-Acylierung von Tetramsäuren mittels Ketenyliden-triphenylphosphan **43**

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde dazu L-Phenylalanin als Ausgangsverbindung verwendet, da Derivate aromatischer Aminosäuren gut löslich in organischen Lösungsmitteln, leicht sichtbar unter dem UV-Licht auf der DC-Platte sind und durch π -Stapelwechselwirkungen möglicherweise sauberer auskristallisieren. Das N-Methyl-Derivat wurde hergestellt, um die während der Diplomarbeit untersuchte Methode zur Darstellung von N-Methyl-Aminosäuren an einem weiteren Beispiel zu testen und weil eine freie NH-Gruppe bei Tetramsäuren teilweise zu unerwünschten Nebenreaktionen durch die Möglichkeit zur Enolisierung tendiert und dadurch auch schnellere Zersetzung stattfindet.

N-Boc-Phenylalanin **137** wurde mit Natriumhydrid deprotoniert und mit Dimethylsulfat gleichzeitig O- und N- alkyliert. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde Aminoester **138** mittels der oben bereits erwähnten Dominosynthese zum Tetramat zyklisiert. Dessen

Hydrolyse zur freien Tetramsäure **139** wurde zuerst im Basischen mit 4 Äquivalenten Natronlauge unter Rückfluss in Ethanol/ Wasser erfolglos versucht. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte keine Veränderung des Methyl-Tetramates. Nach Standard-bedingungen, das heißt 24 Stunden bei Raumtemperatur in konzentrierter Salzsäure, wurde **139** quantitativ erhalten.

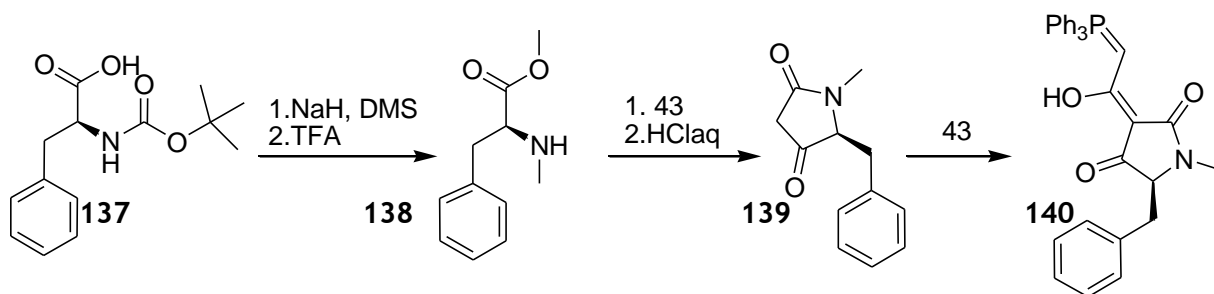


Abb. 51: Darstellung des Tetramsäure-3-Acyllides **140**

Die anschließende Acylierung mittels Ketenylidentriphenylphosphoran **43** wurde zuerst unter den von Schobert et al. beschriebenen Standardbedingungen versucht⁵². Obwohl dabei ein weißer Feststoff ausfiel, welcher nicht das Produkt **140** darstellte, war **140** weder auszukristallisieren, noch säulenchromatographisch zu reinigen.

Im Abschlussvortrag der Diplomarbeit habe ich festgestellt, dass nach Einrotieren der Reaktionslösung ein schwarzer zäher „Schlonz“ entstand.

Andrea Schlenk hatte auch schon lange vor mir erfolglos versucht, das Ylid darzustellen, da es ja eine mögliche Vorstufe in ihrer Synthese von Raveninsäure war.

Als nach einigen Monaten bei Raumtemperatur das zähe Öl im Kolben fest geworden war, hatte sich die Konsistenz zu einem braunen krümeligen Feststoff gewandelt, welcher schon eher nach Ylid aussah. Daher habe ich diesen in THF gelöst und ein Äquivalent KOtBu hinzugegeben, woraufhin sich eine deutliche Farvertiefung zeigte. Dann wurde die Lösung über Nacht mit zwei Äquivalenten Anisaldehyd gekocht (Abb. 52).

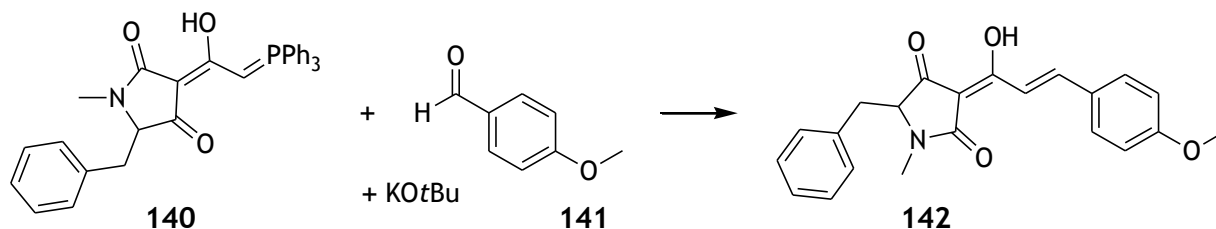


Abb. 52: die erste nachgewiesene „Schlempf- Reaktion“

Nach Einrotieren entstand beim sauren Extrahieren eine fluoreszierende neongelbe Färbung. Die dünnschichtchromatographische Analyse (Abb. 53) zeigte eine neue Verbindung **142**, welche nach Anfärben mit schwefelsaurer Molybdophosphorsäure-Cersulfat- Lösung eine persistierende Gelbfärbung aufwies. Als Referenz aufgetragener PMB- Alkohol **143** zeigt nur eine geringe R_f - Differenz, aber eine deutlich andere Färbung.

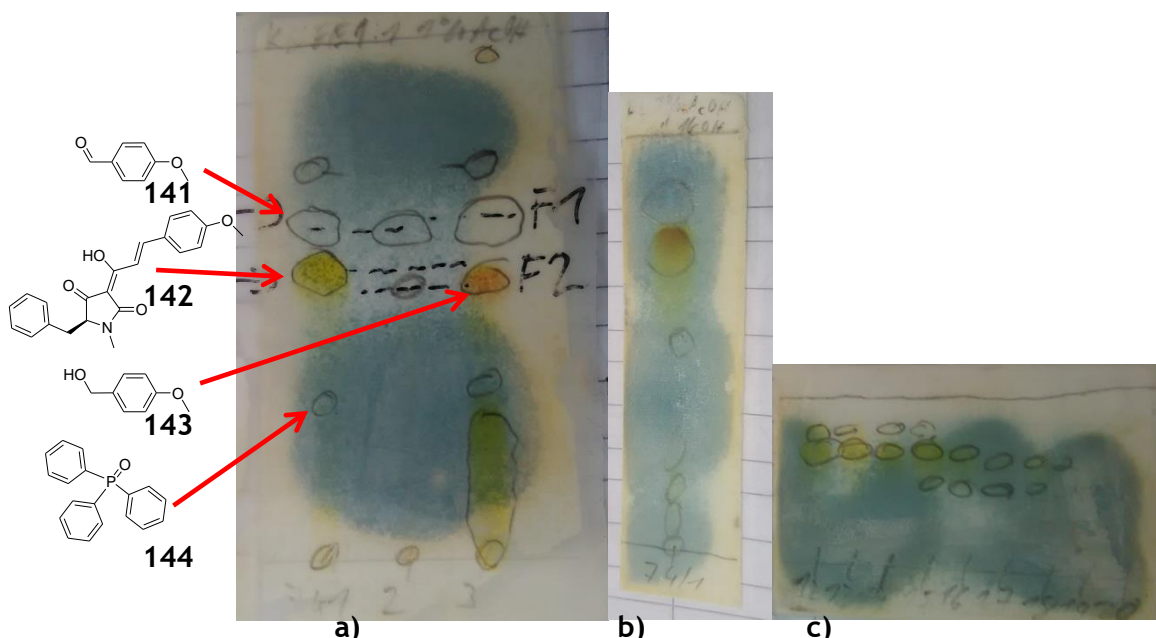


Abb. 53: DC- Analyse der ersten Schlempp- Reaktion a) Rohprodukt und Referenz in Kyklohexan⁵³/EE 1:1 + 1% AcOH; b) Rohprod. und c) Fraktionen der Säulenchromatographie in EE + 1% AcOH, 1% MeOH

Nach säulenchromatographie an Silicagel (Abb.53 c) erhielt ich in dieser Fraktion eine geringe Menge eines bräunlichen Öles, welches in Lösung wieder gelb fluoreszierte. Im ¹H-NMR- Spektrum konnte man an den übereinstimmenden Integralen der aromatischen Methoxy- und der N-Methylgruppe deutlich die Verknüpfung des Anisaldehydes mit der Tetramsäure erkennen.

Dies war das erste Mal, dass ein Produkt dieser Wittig-Reaktion nachgewiesen wurde.

Erst danach haben Andrea Schlenk und ich gemeinsam die Darstellung und Isolierung des Ylids verfeinert, sodass es als goldener Schaum gewonnen werden kann. Aufgrund unserer Arbeit bei der Etablierung dieser Methode benannte sie Herr Schobert scherzhaft nach einer Kombination unserer Namen: „Schlempp- Reaktion“.

3.2.2 Untersuchungen zur Wittig- Reaktion der Tetramsäure-3-Acyl-Ylide

Nachdem ich bewiesen hatte, dass die Wittig-Reaktion abläuft, habe ich anhand der obigen Standardreaktion (Abb. 52) in THF mit KOtBu den Einfluss verschiedener Basen und Lösungsmittel auf mehrere Parameter untersucht.

Aus der Erfahrung verschiedener Derivate zeigte sich, dass diese Wittig- Reaktion mit 70-80% abläuft. Die 3- Acyltetramsäuren lassen sich in dieser Ausbeute gut am Ionentauscher und auch über Umkehrphasensäule isolieren. Bei der präparativen HPLC tritt immer ein hoher Substanzverlust (siehe unten zum Thema „Reinigung der 3-Acyl-Tetramsäuren“) auf, so dass man nur etwa 20- 30 % isolieren kann, abhängig von der Löslichkeit der Verbindungen in Methanol mit Wasseranteilen.

Für eine isolationsunabhängige Evaluierung der Syntheseeffizienz nutzte ich einerseits das ^{31}P - NMR-Spektrum des Rohproduktes und andererseits das Integral von Triphenylphosphinoxyd **144** auf der analytischen HPLC als internen Standard. Die übereinstimmenden Integrale von **144** zeigen, dass analoge Mengen eingespritzt wurden. Ein möglichst großes Verhältnis von **144** als Produkt gegenüber **141** als Edukt zeigt eine effizientere Umsetzung. Die folgenden Ergebnisse können aus den Versuchen A-H (siehe Tabelle 2) abgeleitet werden:

- ❖ Die schlechte Löslichkeit von K_2CO_3 und Methanolat in THF führt zu einer unvollständigen Aktivierung und somit unvollständigen Umsetzung des Ylids (B,C)
- ❖ Die organische Aminobase DABCO führt zur gewünschten Umsetzung mit ähnlich gutem Ergebnis wie KOtBu , jedoch auch zu Phosphor-Nebenprodukten (D)
- ❖ Die Erhöhung der Reaktionstemperatur in Toluol führt bei diesen stabilen Verbindungen zu einem deutlich höheren Umsatz (E)
- ❖ Kochen in Benzol sowie eine Erhöhung der Aldehyd- Äquivalente verbessern das Ergebnis nicht (F,H)
- ❖ Die Verwendung von DCM führt trotz der niedrigeren Temperatur zum zweitbesten Umsatz dieses Tests (G)

Tabelle 2: Einfluss verschiedener Basen und Lösungsmittel auf die Wittig- Reaktion von **140**

An-satz	Variation	Fläche 142 (λ_{max} 402 nm, t_{R} 24,2 min)	Fläche 144 (λ_{max} 228 nm, t_{R} 15,7 min)	Verhältnis 144/ 141	^{31}P - NMR Rohprodukt
A	KOtBu	20	47	0,8	Nur Ph_3PO
B	K_2CO_3	14	37	1	Noch Ylid; Dreck bei 21.6
C	NaOMe	17	44	0,7	Wenig Ylid; Dreck bei 21.6
D	DABCO	28	44	0,8	Kein Ylid, Dreck bei 22
E	Toluol	14	41	4,4	Nur Ph_3PO
F	Benzol	13	48	1,3	Nur Ph_3PO
G	DCM	7	20	1,7	Nur Ph_3PO
H	3Äq. 141	13	45	1,2	Nur Ph_3PO

Weiterhin muss ich erwähnen, dass **142** in zwei tautomeren Formen auftritt, welche wahrscheinlich die Exo-enol-Z/E- Isomere darstellen. Bei den aliphatischen Derivaten liegen diese Fraktionen in der HPLC direkt nebeneinander und unterscheiden sich nicht in der Lage des Absorptionsmaximums. Die beiden Isomere von **142** unterscheiden sich jedoch stark (siehe Abbildung 54).

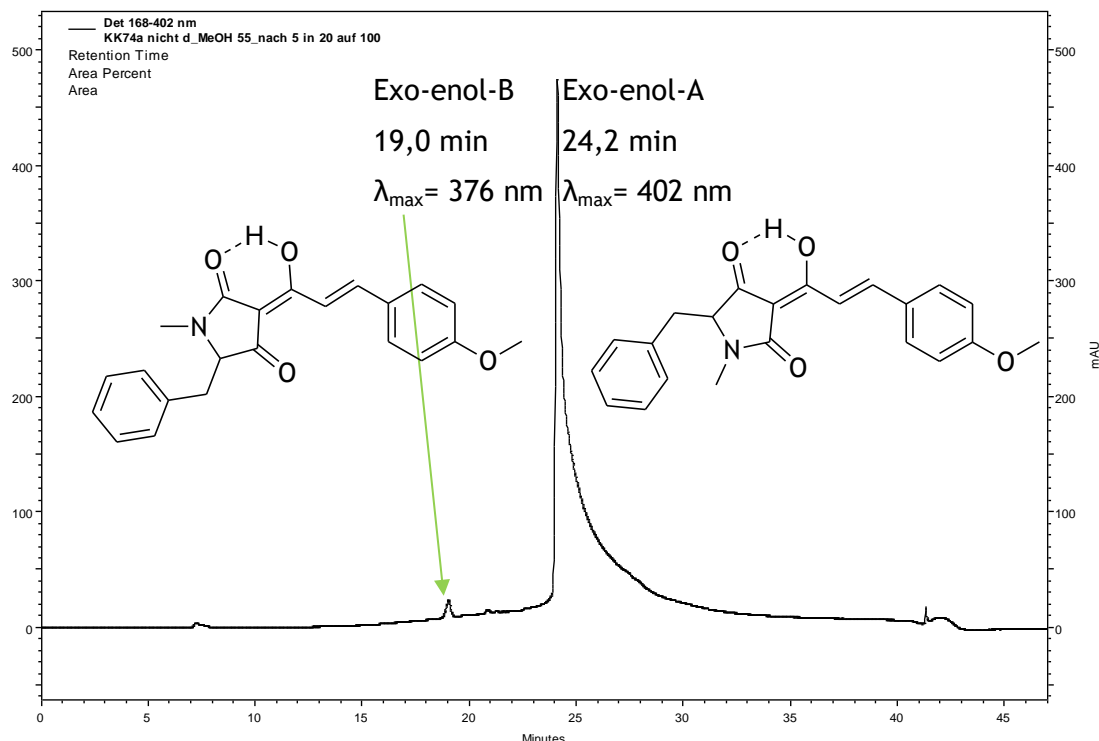


Abb.54: HPLC-Chromatogramm von **142** bei 402 nm

Die Annahme, dass es sich bei diesen beiden Fraktionen um die beiden Exo-enol-Z/E-Isomere handelt, wurde untermauert durch die Umkehr deren Verhältnisse, nachdem **142** in ihren BF_2 -Komplex überführt worden war. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Verbindung zur Hydrolyse des Komplexes 2h in Methanol gekocht wird, was durch die protischen Eigenschaften und die Wärmezufuhr eigentlich Tautomerisierungen begünstigt. Dennoch war in der darauffolgenden HPLC-Analyse das Verhältnis beider Fraktionen umgekehrt, das heißt, die Verbindung lag danach fast vollständig als Exo-B-Isomer vor. Die Zuordnung der oben dargestellten Isomere beruht auf der IR-Analyse des Borkomplexes von **142** im Rahmen der Untersuchungen der IMDA-Zyklisierung (Abschnitt 3.3.5 und 4.5). Weiterhin konnte ich die bekannte Tatsache bestätigen, dass auch die Polarität des Lösungsmittels einen großen Einfluss auf das Verhältnis der Tautomere hat. So erhöhte sich der Anteil des Exo-B-Isomers durch den Wechsel des Lösungsmittels für die Synthese von THF zu Benzol von 1,5% auf 4%.

Auch bei Penicillenol B1 **11** konnte ein ähnliches Phänomen beobachtet werden; hier vertauschte sich das Verhältnis, nachdem die Probe mehrere Wochen in DMSO gelöst aufbewahrt worden war.

Bei der Synthese des Oligoenoylderivates **145** (siehe Abschnitt 4.1) stellte sich heraus, dass beim Kochen in THF Zersetzung stattfand. Zum erfolgreichen Darstellen der Zielsubstanz führte die Reaktionsführung in DCM bei Raumtemperatur. Diese hat sich dann auch bei der Synthese des empfindlichen Dimers **146** (siehe Abschnitt 3.2.4) als nützlich erwiesen. Bei der Darstellung des mehrfach ungesättigten Methiosetin-vorläufers **147** (siehe Abschnitt 4.5)

unter denselben Bedingungen konnte ich die rasante Reaktionskinetik beobachten, denn es hatte sich schon nach wenigen Minuten bereits laut HPLC deutlich nachweisbar Produkt gebildet.

Viele natürliche 3-Acyl-Tetramsäuren, z.B. die Penicillenole, weisen eine α -Methyl-gruppe auf. Während meiner Diplomarbeit habe ich erfolgreich nach Vorschrift das Carbomethoxyylid mit Methyljodid α -methyliert. Die Tetramsäure-3-Acyl-Ylide werden erst nach Zugabe von Basen am Kohlenstoff nukleophil, deshalb wurde für eine alternative Synthese von Penicillenol A **10** das Ylid **148** wie üblich zuerst mit KO^tBu aktiviert und dann Methyljodid bzw. DMS zugegeben. Leider konnten die Rohprodukte weder als die Zielverbindung **149** oder ihre Salze identifiziert werden, noch ergab eine direkte Weiterreaktion mit Hexanal das gewünschte Produkt **150**.

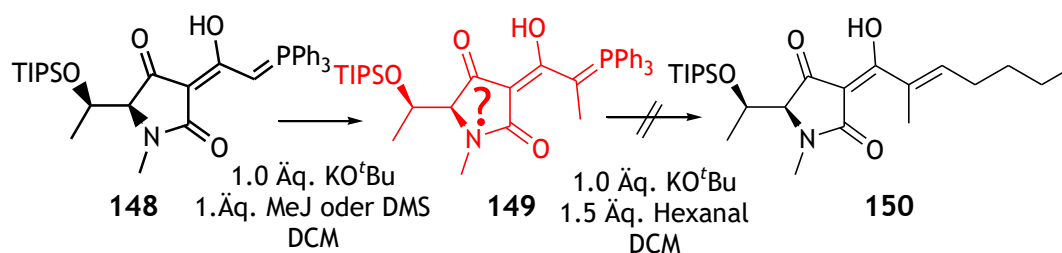


Abb.55: Versuche zur α -Methylierung von Ylid **148**

Testversuche mit dem Phenylalaninderivat **140** zeigten, dass Weiterreaktionen (Abb.56) mit Anisaldehyd (**152**, HRMS für C₂₃H₂₂NO₄⁻ berechnet: 376,1543; gefunden: 376,1559 und für C₂₃H₂₄NO₄⁺ berechnet: 378,1700; gefunden: 378,1697) und p-Nitrobenzaldehyd (**153**), nicht aber mit Decanal, tatsächlich stattfanden. Allerdings konnten die Produkte nur unter Einsatz der sehr starken Base Natriumhydrid erhalten werden, was eine Erklärung dafür sein kann, dass enolisierbare Aldehyde zu schnell in Nebenreaktionen, wie Aldoladdition, abreagieren. Außerdem führen so stark basische Bedingungen bei Threoninderivaten immer zur Eliminierung.

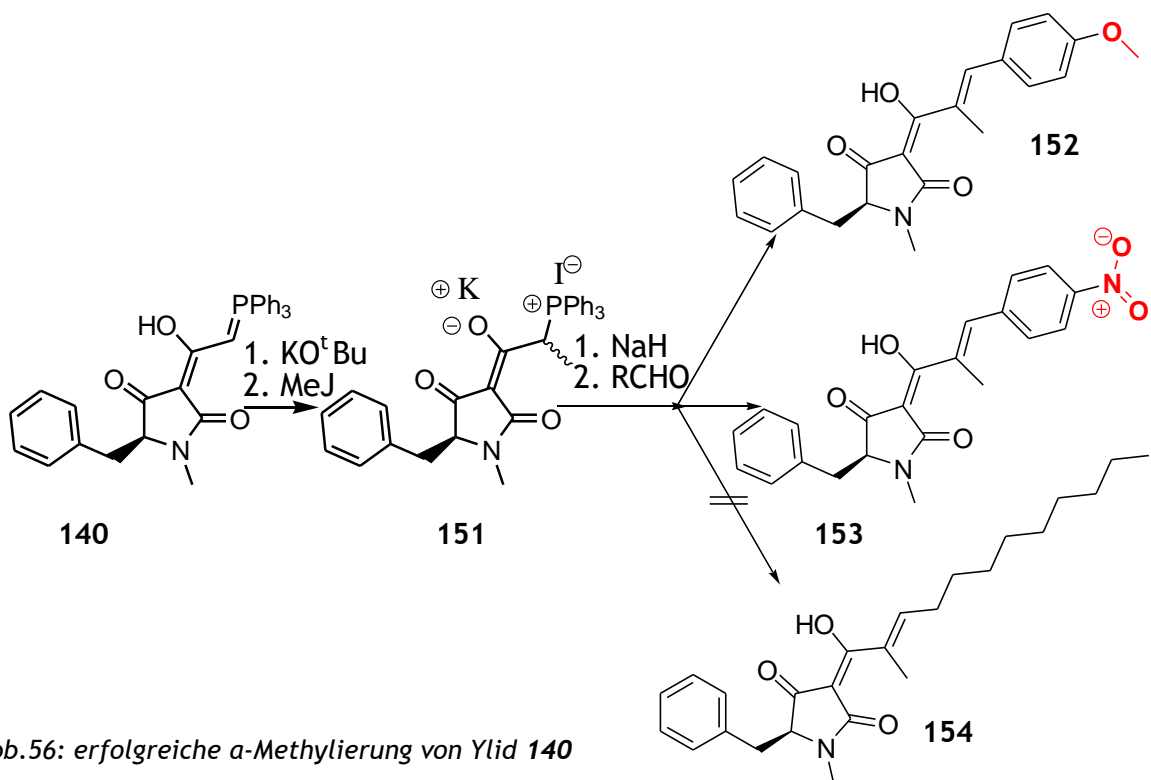


Abb.56: erfolgreiche α -Methylierung von Ylid 140

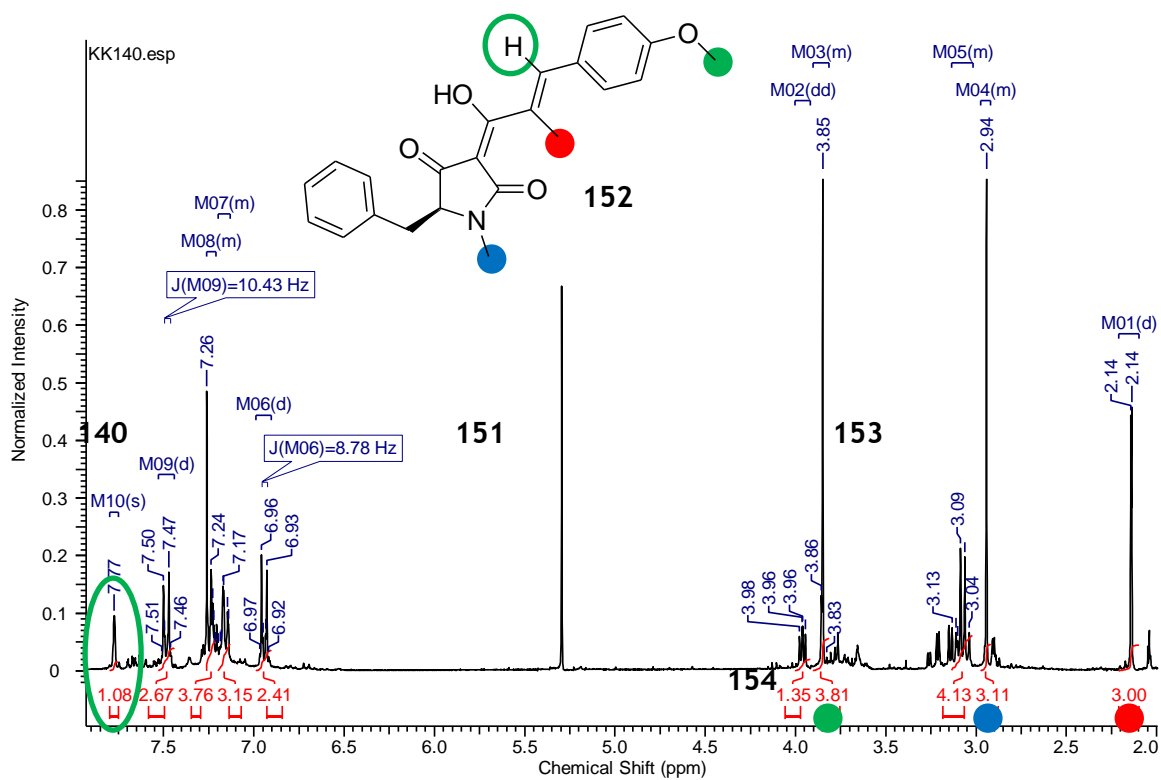


Abb.57: ^1H - NMR- Spektrum von 152

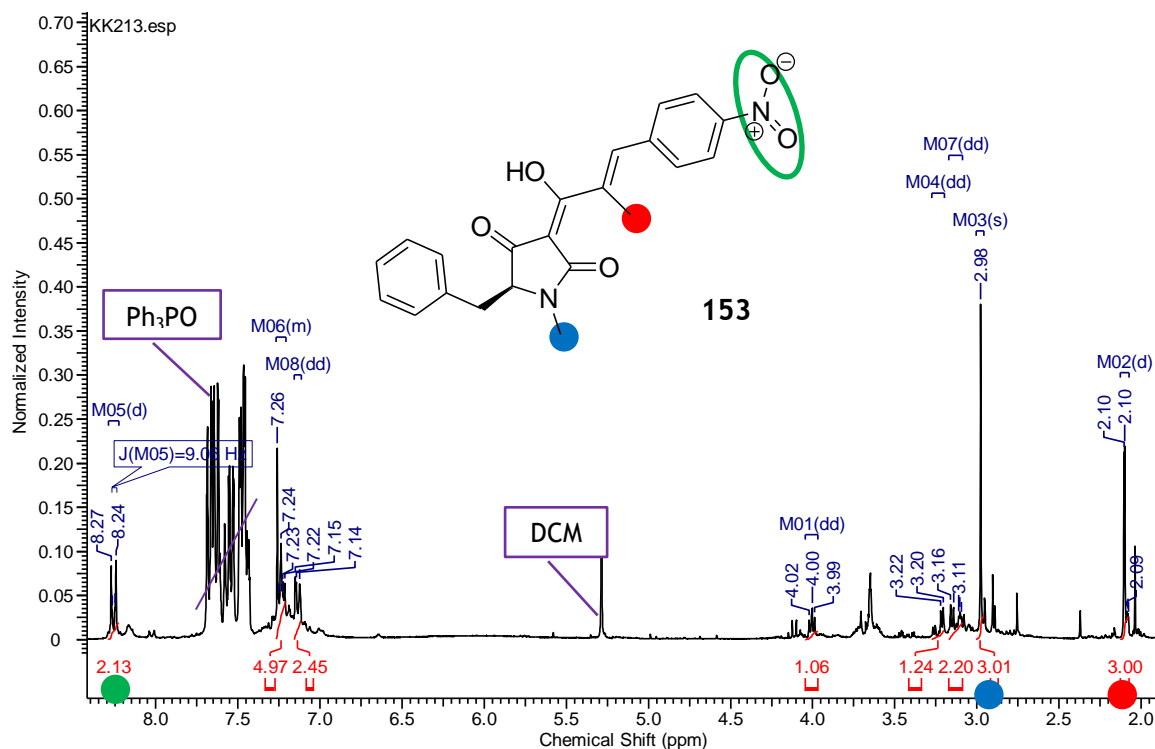


Abb.58: ^1H - NMR- Spektrum von **153**

3.2.3 Problematische Reinigung von 3- Acyltetransäuren

Nach dem eindeutigen Beweis, dass 3-Acyltetransäuren aus der Wittig- Reaktion der Ylide entstanden waren, begannen allerdings neue Probleme, nämlich die der Aufreinigung. Die typischen 3-Acyltetransäuren mit aliphatischen oder aromatischen Seitenketten haben als Substanzklasse völlig andere Eigenschaften als ähnliche Substanzen ohne das 3-Acylsystem. Sie sind einerseits hochpolar, damit kaum löslich in Ether und lassen sich deswegen nur mit DCM und Essigester aus Wasserphasen extrahieren. Andererseits sind sie auch relativ apolar und in Methanol mit schon geringen Wasseranteilen nicht mehr löslich und auch deprotoniert nicht in die basische Wasserphase zu extrahieren. Weiterhin haben sie eine starke Neigung Metalle zu chelatisieren, was erneut die Eigenschaften verändert. Außerdem führt ihr Auftreten in verschiedenen Tautomeren dazu, dass sich die Zielsubstanz bei der HPLC auf mehrere kleine Fraktionen verteilt, welche teilweise unter Verunreinigungen nicht auffallen, gleichzeitig aber die Ausbeute an der sauberen Hauptfraktion beträchtlich schmälern. Außerdem verteilen sich die Derivate mit apolaren Seitenketten offenbar als feiner Film über die C-18-Säulenoberfläche, was ebenfalls zu hohem Substanz-verlust von ~50% führen kann. Ein verblüffendes Beispiel dafür war die Gewinnung der folgenden Dodecenoyl- Tetransäure **155** aus der ersten HPLC-Reinigung nach Gefriertrocknung als 20 mg eines roten Öles, welches noch Spuren von Phosphinoxyd **144** enthielt (obwohl **155** und **144** minutenlangen Retentionszeitunterschied auf-wiesen), ansonsten aber sauber war.

Um für die Zelltests eine noch höhere Reinheit zu gewährleisten, führte ich eine zweite HPLC-Reinigung durch; wieder musste die Substanzmenge wegen der schlechten Löslichkeit in Methanol mit Wasseranteilen auf mehrere Läufe verteilt werden. Das folgende Chromatogramm aus der zweiten präparativen HPLC bestätigt die gute Reinheit und das Auftreten der üblichen zwei exo-Enol-Tautomere. Dennoch blieben von den 20 eingesetzten nach der zweiten HPLC nur 8 mg übrig!

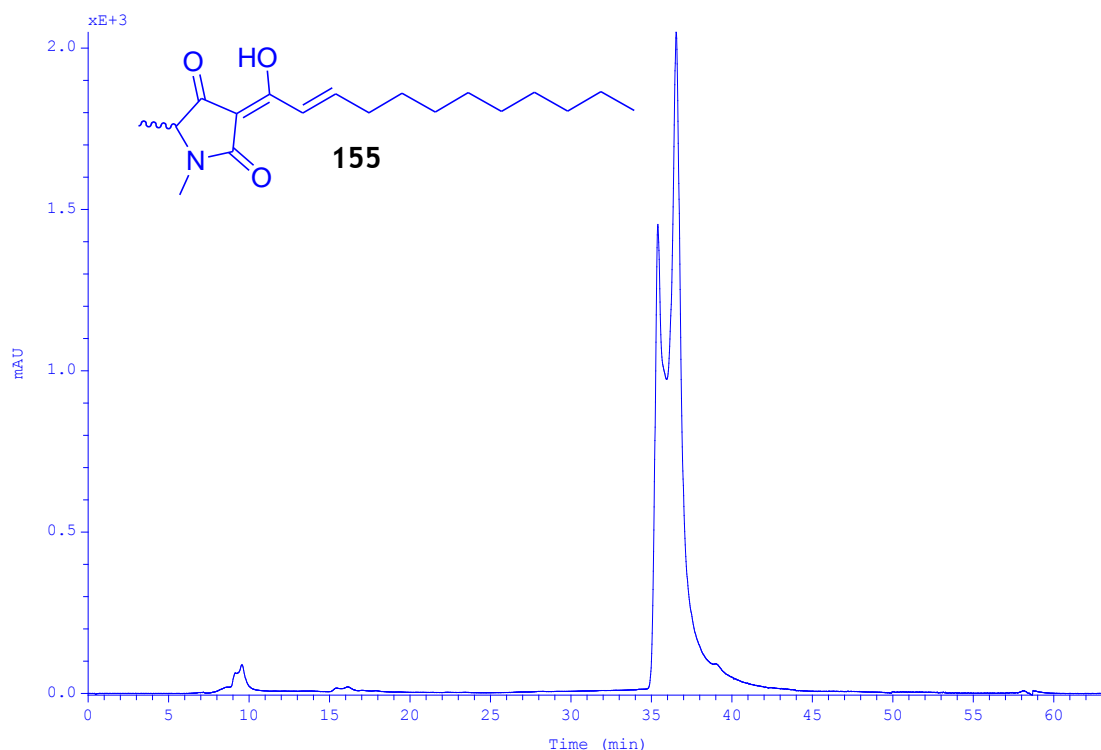


Abb.59: Chromatogramm der präparativen HPLC bei der zweiten Reinigung von **155**

Die Reinigung über Ionentauscher kann bei stabilen Substanzen ganz gut verlaufen, allerdings stellt die Elution oft ein Problem dar, da Hochsalzelution einen hohen Wasseranteil erfordert, womit die Verbindungen nicht löslich sind. Methanol-Wasser-Mischungen erfordern außerdem vor der Extraktion eine Einengung am Rotationsverdampfer, was eine thermische und hydrolytische Belastung für die Substanzen darstellt. So bleibt oft nur die Elution mit DCM-Ameisensäure-Mischung, welche auch nicht jede Substanz stabil übersteht.

Dies alles gilt in verstärktem Maße für die von mir meist synthetisierten N-Methyl-3-Acyltetramsäurederivate, welche nur in den seltensten Fällen bei Raumtemperatur Feststoffe sind und besonders schnell bei geringer Wasserzugabe aus Methanol ausölen. Im Gegensatz dazu sind die gleichen Verbindungen- nur mit NH statt N-Me- bei viel höheren Wasseranteilen in Methanol löslich, was die HPLC-Trennleistung verbessert. Außerdem sind es meist Feststoffe, die man aus DCM mit Hexan ausfällen und abfiltrieren kann.

Für Derivate mit kurzen, polaren Seitenketten (z.B. Tetrahydrofuranylderivat **156**, *vide infra* Abschn. 3.2.4) bietet sich eine Säure-Base-Extraktion an, wodurch sich leicht z.B. die Hauptverunreinigung der Wittig-Reaktion, Phosphinoxyd **144**, abtrennen lässt. Derivate mit apolaren Seitenketten bilden im Basischen Tenside, die eine Phasentrennung stark behindern.

Tabelle 3: Übersicht über einige Reinigungsmethoden für 3-Acyltetransäuren:

Methode	Vorteile	Nachteile
HPLC	theoretisch universell	<ul style="list-style-type: none"> ■ nur geringe Mengen ■ hoher Substanzverlust ■ schlechte Löslichkeit in Methanol mit Wasseranteil
Ionen-austauscher	<ul style="list-style-type: none"> • billig • für große Mengen 	keine analyt. Reinheit
Metall-komplexe fällen	für große Mengen	<ul style="list-style-type: none"> ■ manchmal keine Feststoffe ■ Vorreinigung nötig ■ nur extrem polar säulbar ■ Entfernung des Metalles nicht immer trivial
BF ₂ -Komplex	<ul style="list-style-type: none"> • apolar • leicht über Normalphase zu chromatographieren 	<ul style="list-style-type: none"> ■ bildet sich nicht quantitativ ■ für Lewisäure-empfindliche Produkte nicht geeignet
Festphasen-extraktion	analytische Reinheit	<ul style="list-style-type: none"> ■ teuer ■ nur µg- Mengen
Elektro-phorese	universell für Säuren	<ul style="list-style-type: none"> ■ Wasserlöslichkeit ■ hoher Aufwand
Umkehr-phasensäule	<ul style="list-style-type: none"> • auch für große Mengen • Säule wiederverwendbar • sehr gute Ausbeute! 	

3.2.4 Umsetzung der Tetransäure-3-Acyl-Ylide mit verschiedenen Oxo-Komponenten

Gleich nachdem ich bewiesen hatte, dass die Tetransäure-3-Acyl-Ylide mit Anisaldehyd reagieren, stellte Herr Schobert eine Liste potenziell interessanter Oxokomponenten als Reaktionspartner zusammen. Das Derivat **157** des einfachsten Ketons, nämlich Aceton **158**, konnte mit KOtBu problemlos erhalten werden.

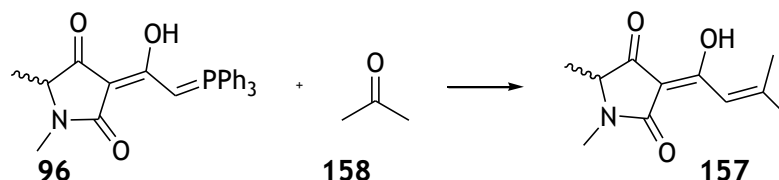


Abb.60: Reaktion von Ylid **96** mit Aceton **158**

In 2-Hexanon **159** allerdings blieb das Ylid unter Rückfluss (127°C) über Nacht stabil und zersetzte sich erst in der Mikrowelle nach 8h bei 160°C.

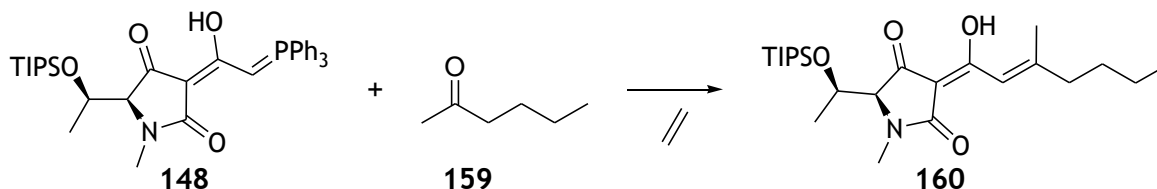
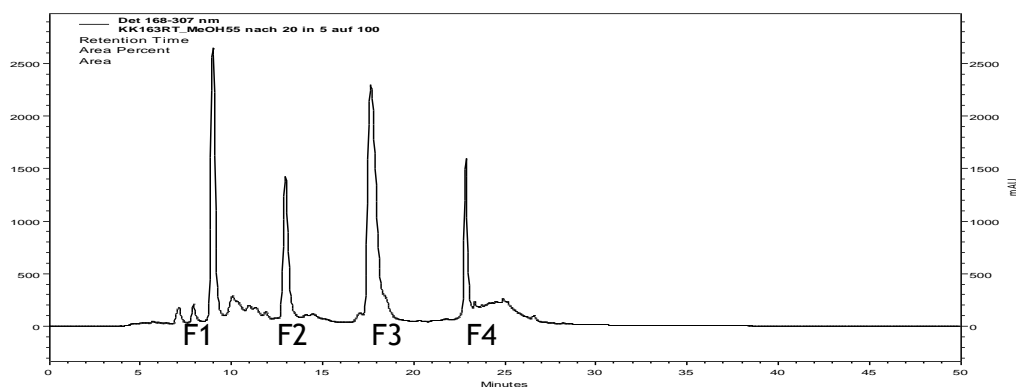
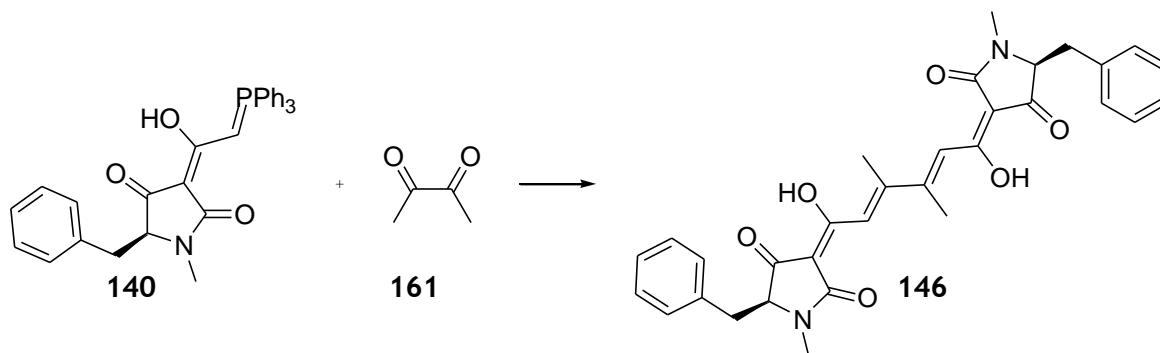


Abb.61: Versuch zur Darstellung von iso-Penicillenol- Derivat **160**

Die Reaktion mit Butan-2,3-dion **161** erwies sich als kompliziert, da in THF unter Rückfluss Zersetzung stattfand und in DCM bei Raumtemperatur nach 20h noch beide Edukte nebeneinander vorlagen. Das Absorptionsmaximum der ersten Fraktion ist typisch für eine 3-Acyltetramsäure mit einer zusätzlichen Doppelbindung, was im Monomer **162** der Fall ist. Die letzte und damit apolarste Fraktion hat das langwelligste Absorptionsmaximum, erklärbar mit dem größten π -System. Leider enthielten die entsprechenden Fraktionen der präparativen HPLC laut analytischer HPLC wieder mindestens drei dieser Fraktionen. Entsprechend können auch in den ^1H -NMR- Spektren der Fraktionen 1, 3 und 4 keine Signale zugeordnet werden. Überraschenderweise stimmt das Spektrum von Fraktion 2 sehr gut mit dem gewünschten dimeren Produkt überein, da nur 1 Signal für die beiden symmetrischen Methylgruppen erscheint, welches sich sowohl im ^1H -, als auch im ^{13}C -NMR von **161** unterscheidet. Die beiden Signale der vier zentralen Kohlenstoffatome der Oligoenseitenkette sind im ^{13}C -NMR wie gewöhnlich nur sehr schwach zu erkennen. Die entsprechenden olefinischen H-Signale resonieren wie üblich im aromatischen Bereich. In der EI- massenspektrometrischen Analyse kann man nur das Edukt **140** erkennen, welches besser ionisiert, als die meisten Phosphorlosen Spezies.



F1: λ_{\max} = 343 nm Monomer **162**

F2: λ_{\max} = 284 nm Edukt-Diacetyl **161**

F3: λ_{\max} = 301 nm Edukt-Ylid **140**

F4: λ_{\max} = 350 nm Produkt **146**

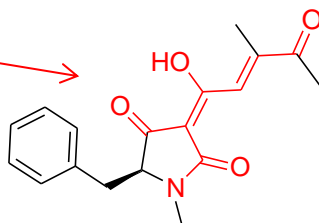


Abb.62: Synthese von **146** und HPLC- Chromatogramm des Rohproduktes bei 307 nm

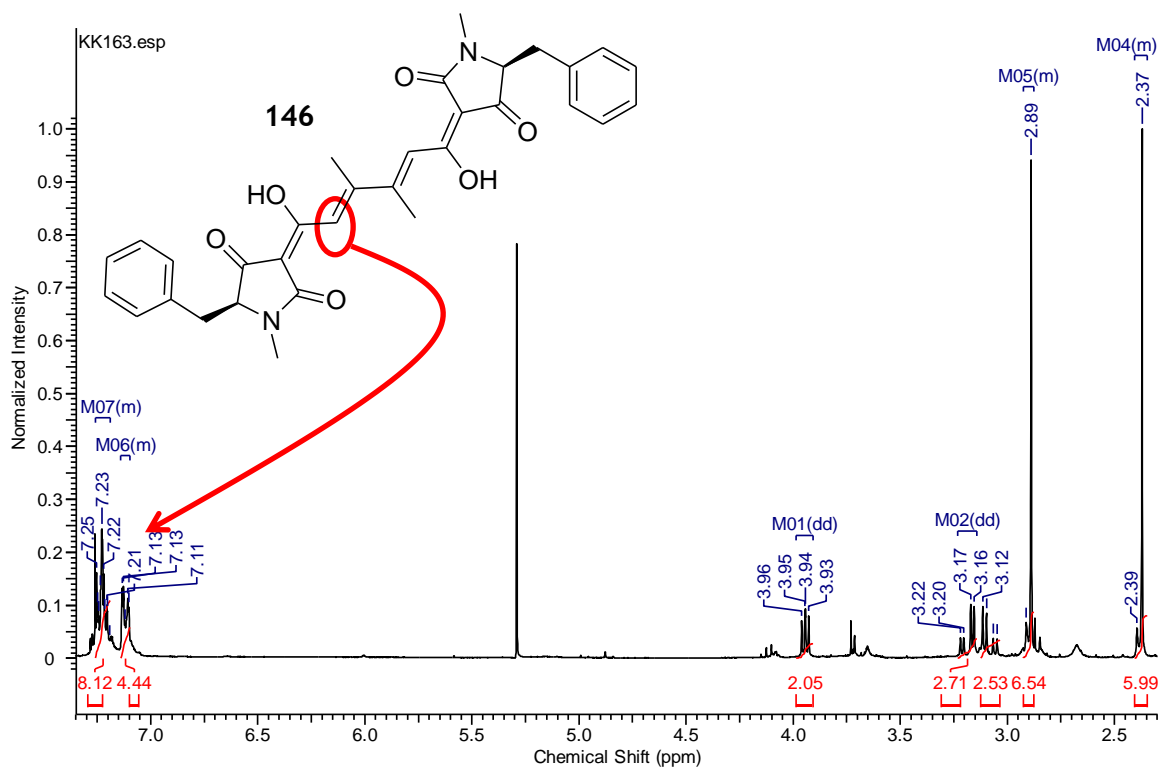


Abb.63: ^1H - NMR- Spektrum von **146**

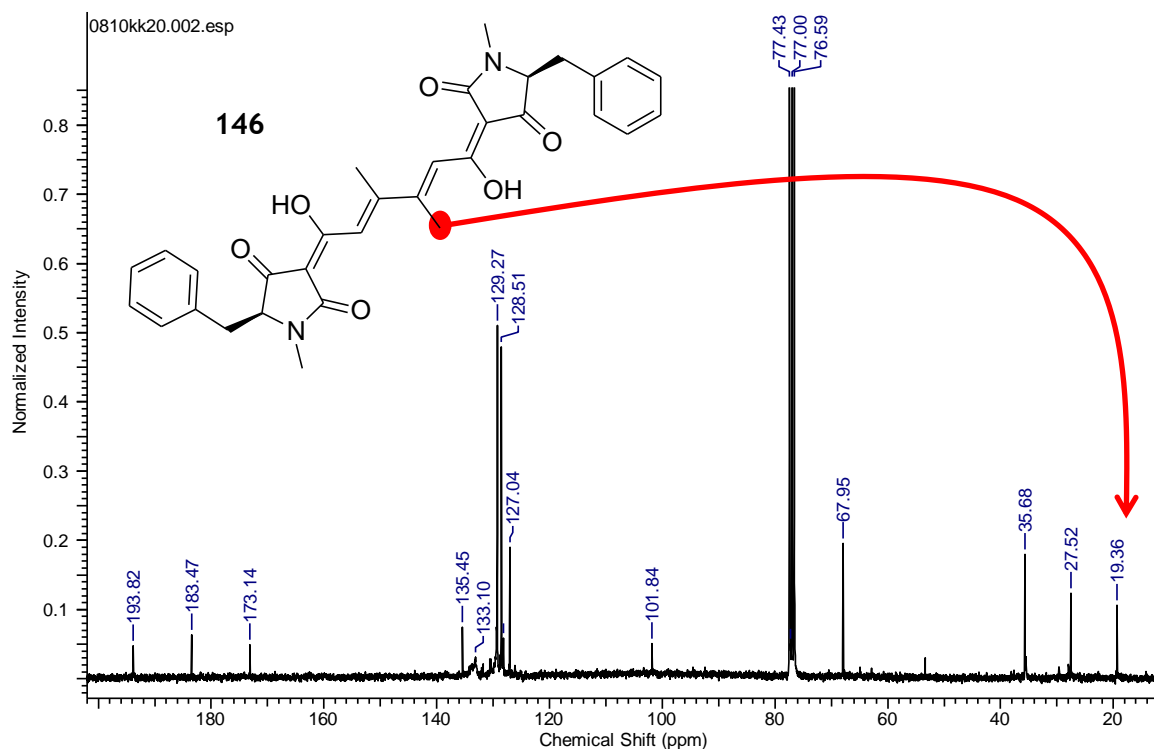


Abb.64: ^{13}C - NMR- Spektrum von **146**

Die Reaktion mit γ -Butyrolactol **163** lieferte nach 20 stündigem Kochen in THF und darauffolgender saurer Aufarbeitung direkt das Additionsprodukt aus dem terminalen Alkohol und der entstandenen elektronenarmen Doppelbindung. Zwei Singulets im ^1H -NMR-Spektrum für die N-Methylgruppe zeigen die entstandenen Diastereomere. Das Produkt **156** konnte durch 2D-NMR- Experimente und EI- massenspektrometrische Analyse ($M^+=315$) eindeutig nachgewiesen werden.

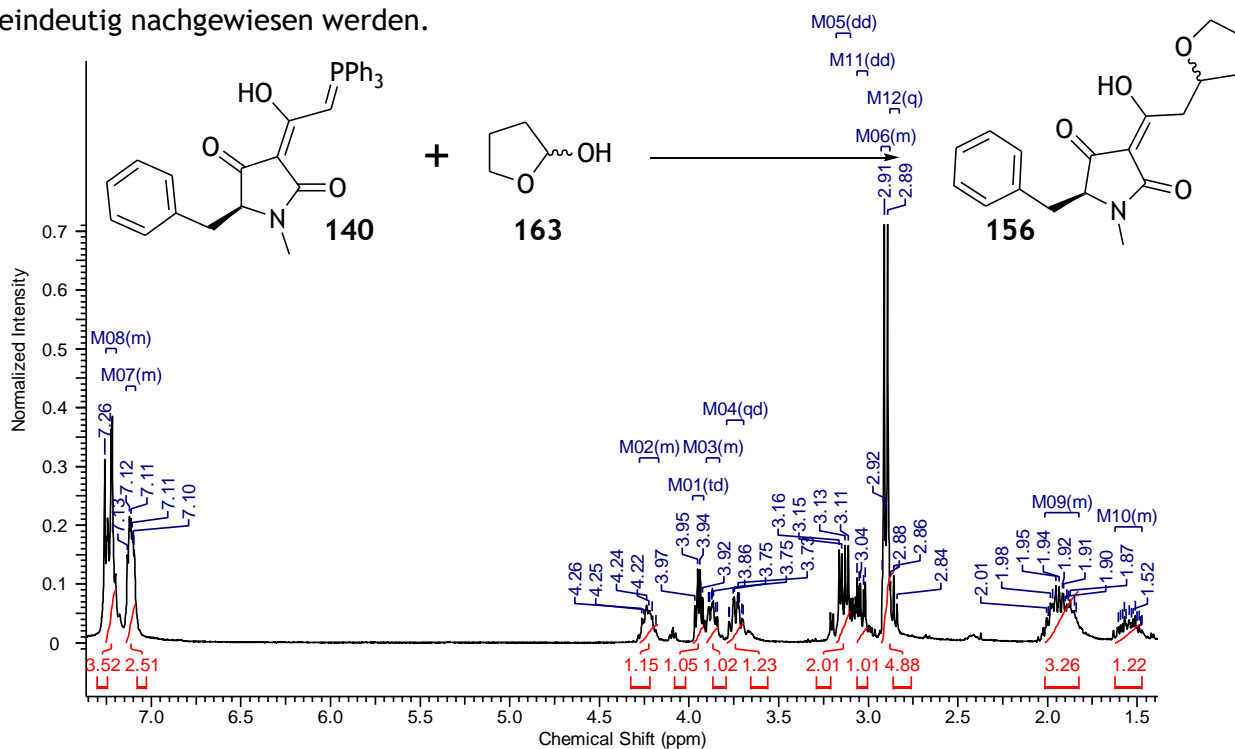


Abb.65: Reaktionsschema und ^1H - NMR- Spektrum zu **156**

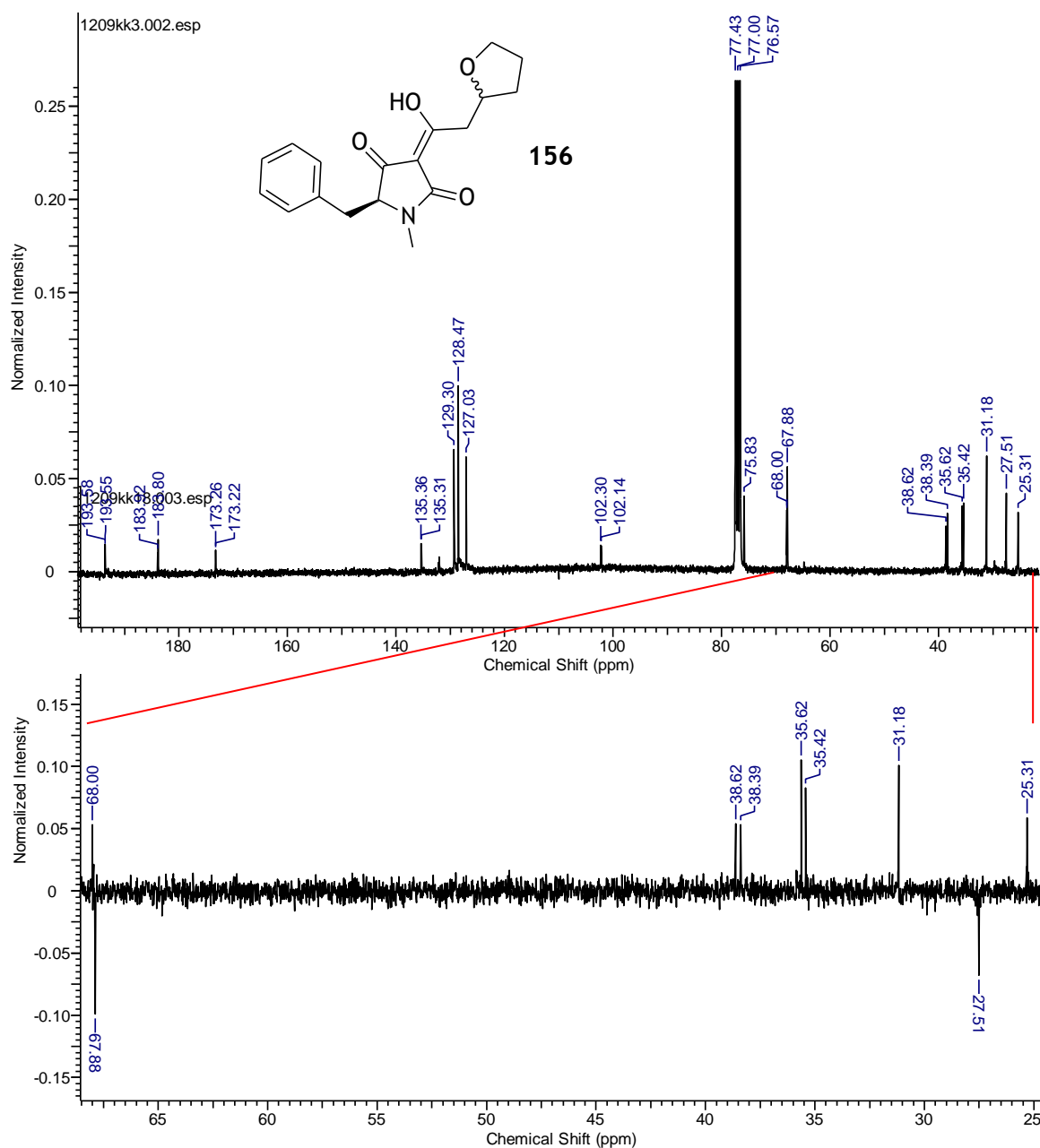


Abb.66: ^{13}C - NMR- Spektrum von **156** mit Ausschnittvergrößerung als JMOD

Ein sehr interessanter Reaktionspartner für **140** wäre auch die Glucose **164**, da auf diese Art und Weise gut wasserlösliche und glycosidähnliche 3-Acyltetramsäurederivate mit wahrscheinlich interessanten biologischen Eigenschaften zugänglich wären. Eine Zyklisierung durch Addition wie bei **156** ergäbe sterisch zu Zuckern sehr ähnliche Verbindungen, die aber wesentlich stabiler wären, als die „echten“ Glycosyltetramsäuren, welche erstens durch Autohydrolyse nur kurz haltbar⁵⁴ sind und zweitens im Organismus durch Glycosidasen abgebaut werden, was die eventuelle pharmakologische Wirkung abschwächt.

Die Synthese allerdings gestaltete sich sehr schwierig, da zur Lösung ungeschützter Glucose **164** eine Mischung aus THF: Pyridin 1: 1,4 nötig war. Nachdem jene über Nacht gekocht und anschließend evaporiert wurde, konnte kein Produkt identifiziert werden.

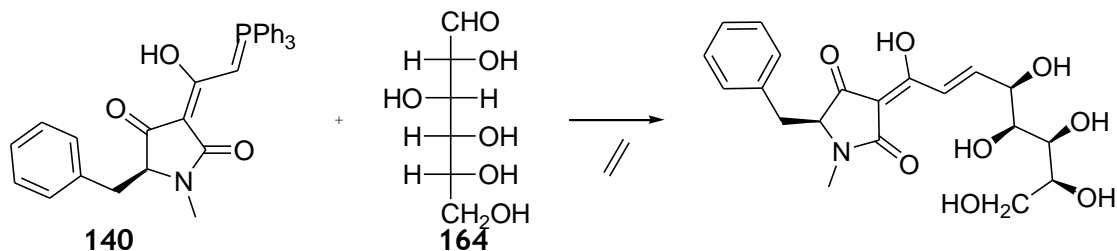


Abb.67: Versuch zur Reaktion von **140** mit ungeschützter Glucose **164**

Sehr leicht herzustellen und gut löslich in organischen Lösungsmitteln ist die peracetylierte Glucose, welche mit Hydrazin schnell anomer entschützt werden kann. Allerdings sind die Ester wohl im Vergleich zum nur gering im Gleichgewicht vorhandenen Aldehyd zu reaktiv, denn die THF-Reaktionslösung verfärbte sich schon bei Raumtemperatur jedesmal sofort nach Zugabe der 2,3,4,6-Tetraacetylglucose **166** tief rot. Nach 15h bei Raumtemperatur war **140** vollständig abreagiert. Das Produkt zeigte im $^1\text{H-NMR}$ ein ähnliches Spektrum wie die 3-Acetyl-tetramsäure, aber das gewünschte Produkt **167** war nicht entstanden.

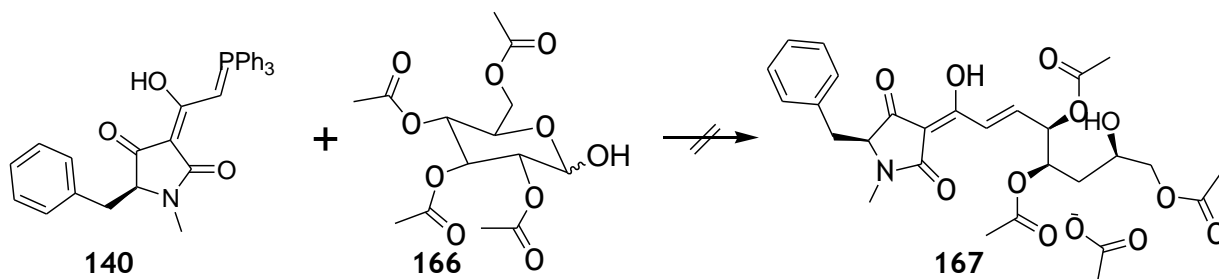


Abb.68: Versuch zur Reaktion von **140** mit acetylierter Glucose **166**

Die analoge 2,3,4,6-Tetrabenzylglucose⁵⁵ **168** war schon schwieriger zu erhalten, da zunächst Perbenzylsaccharose **169** dargestellt und daraufhin hydrolysiert werden musste. Da das Rohprodukt nicht kristallisierte, wurde zunächst grob über Silicagel chromatographiert; die entsprechend angereicherte Fraktion ließ sich dann sauber um-kristallisieren.

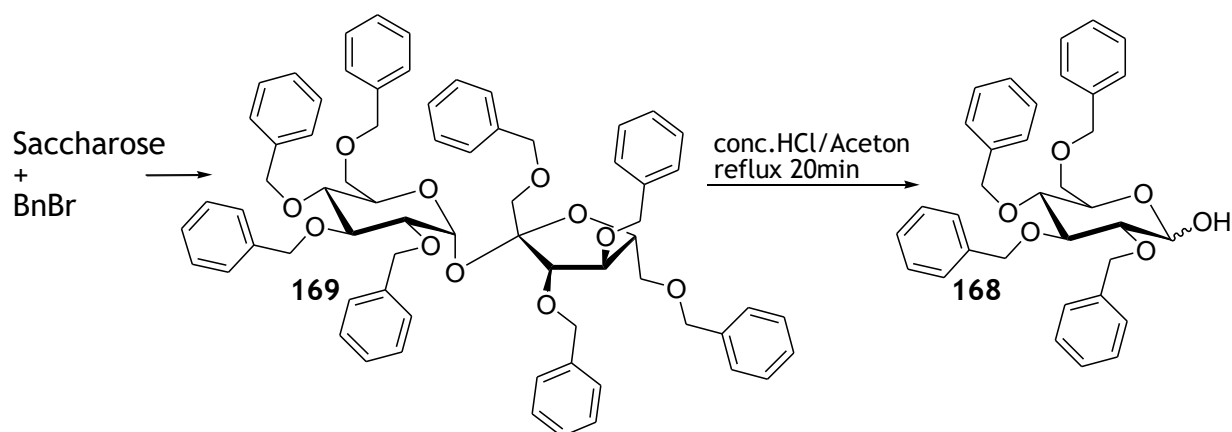


Abb.69: Darstellung von 2,3,4,6-Tetrabenzylglucose **168**

Aus den ersten zwei Umsetzungen von **168** mit **140** (R=Me) konnte kein Produkt isoliert werden. Allerdings entstanden nach Kochen des Ylids **170** (R=Boc) in THF und anschließender Boc- Abspaltung mit TFA vier verschiedene Produkte, von denen nur F3 (siehe Abb.71) das charakteristische Absorptionsmaximum von 323 nm besaß, welches typisch ist für 3-Acyltetramsäuren mit einer weiteren konjugierten Doppelbindung neben dem exocyclischen Enol. Die anderen drei Fraktionen hatten alle ein Maximum von 406 nm, welches übereinstimmt mit dem von Torribiellon D, welches kürzlich von Sebastian Bruckner dargestellt⁵⁶ wurde und drei konjugierte Doppelbindungen neben dem exocyclischen Enol besitzt. Die Erklärung für die zwei zusätzlichen Doppelbindungen, im Vergleich zum gewünschten Produkt, kann das Auftreten von Eliminierung sein, getrieben durch das Hervorrufen eines größeren π - Systems. Diese vier Fraktionen konnten zwar mit präparativer HPLC getrennt werden, aber leider führen im ^1H -NMR die vielen ähnlichen Signale und das Fehlen eindeutiger Bezugssignale (z.B. Singulett, wie das von N-Me) dazu, dass die Produkte nicht eindeutig bestimmt werden konnten. Außerdem „schieben“ die Benzylgruppen Elektronendichte, was bei Lewisäure- katalysierten Glycosylierungen das Oxocarbeniumion stabilisiert und so länger dem Akzeptor zur Verfügung stellt; die Reaktivität des Aldehyds wird dadurch aber vermindert.

Da diese Wittig- Reaktion, wie oben schon erwähnt, auch bei Raumtemperatur abläuft, wird dies der nächste Versuch sein, um das gewünschte Produkt ohne Auftreten von Eliminierung zu erhalten.

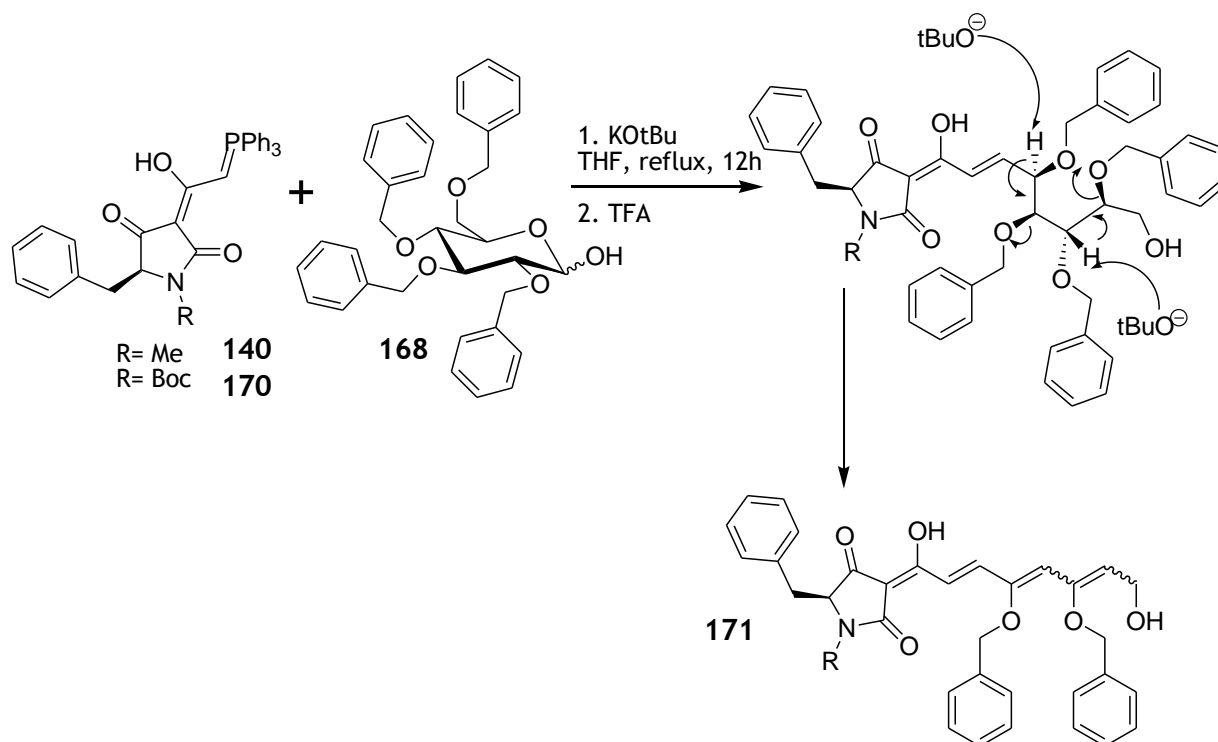


Abb.70: Auftreten von Eliminierung bei der Umsetzung von **168** in kochendem THF

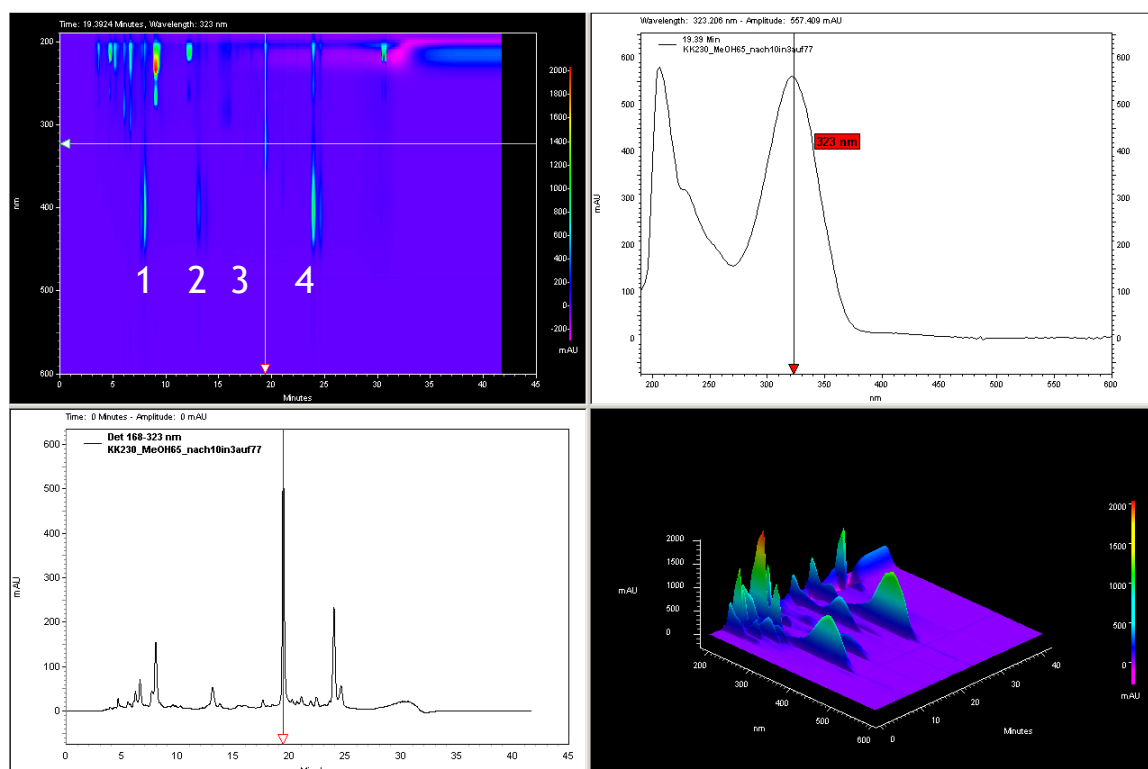


Abb.71: HPLC- Analyse des Rohproduktes **171**

3.3 Synthese von natürlichen 3-Acyltetramsäuren

3.3.1 Synthese der geschützten Tetramsäure für Penicillenol C 12

Der Tetramsäurebaustein von **10** und **12** enthält zwei Stereozentren. Wie schon oben erwähnt dienen Aminosäuren in der Biosynthese als Vorläufer der Tetramsäuren. Aminosäuren sind aus Proteinhydrolysaten und mittels anderer Verfahren in ihrer natürlichen Konfiguration leicht optisch rein erhältlich und deshalb auch als Ausgangsmaterial für Laborsynthesen geeignet.

Als erster Schritt vom ungeschützten Threonin **172** aus existieren entweder sauer katalysierte Veresterungen, weil im Säuren das Amin nicht nucleophil ist, oder Schützungen mit Carbamatderivaten, welche selektiv mit dem Amin reagieren.

Die zwei gängigsten Ester für die Zyklisierung zum Tetramat sind Methyl und Benzyl. Der Methylester lässt sich am leichtesten mit SOCl_2 in Methanol quantitativ darstellen. Die Benzylveresterung läuft unter deutlich schlechteren Ausbeuten und die Entfernung des hochsiedenden Benzylalkoholes kann Probleme bereiten. Der Trimethylsilylester kann nur im basischen mit bereits geschütztem Stickstoff eingeführt werden. Entschützung des Methyltetramates jedoch läuft nur in konzentrierter wässriger HCl , was die Wahl der zweiten Sauerstoffschutzgruppe im Threonin drastisch einschränkt. Somit bleibt der Benzylester als guter Kompromiss zwischen flexibler Einführung und schonender Entschützung (katalyt. Hydrierung).

Die zwei gängigsten Carbamatschutzgruppen sind Boc und Fmoc. Die Schützung unterscheidet beide nicht, wohl aber liefert die Entschützung von Boc im Säuren nur gasförmige Nebenprodukte, weshalb keine Reinigung erforderlich ist. Nach der Fmoc-Entschützung muss quantitativ schwer lösliches Piperidin- Dibenzofulvenaddukt abgetrennt werden.

Ein weiteres wichtiges Merkmal bei den Penicillenolen stellt die Methylgruppe am Stickstoffatom dar. Diese ist in proteinogenen Aminosäuren nicht enthalten. Bringt man die Methylgruppe samt dem Stickstoff als Methylamin bei der Synthese ins Molekül ein, so ist eine enantioselektive Reaktionsführung erforderlich und die natürlichen Quellen der Aminosäuren können nicht mehr genutzt werden. Bei der Monoalkylierung von Aminen ist Mehrfachalkylierung oft eine unerwünschte Nebenreaktion, da sekundäre Amine nucleophiler sind als primäre. Daher existieren mehrere Möglichkeiten, die Reaktivität des Stickstoffatoms zu reduzieren. Eine Methode, die in meiner Diplomarbeit verwendet wurde (Abb. 72), überführt das Amin **173** mittels Formaldehyd im sauren Medium in das nicht nucleophile Immoniumion⁵⁷ **174**. Dieses kann durch die benachbarte Hydroxygruppe leicht zum Oxazolidin **175** zyklisieren und so als einigermaßen stabiles Zwischenprodukt grob vom

nicht reaktierten Formaldehyd abgetrennt werden. Anschließend wird unter großem Überschuss an TFA **174** mit Triethylsilan zu **176** reduziert. Trotzdem wurde noch zweifach alkyliertes Produkt **177** isoliert. Obwohl letztere Reaktion unter trockenen Bedingungen geführt wurde, haben wohl Spuren von Wasser zur Hydrolyse von Immoniumionen und damit zur Freisetzung von Formaldehyd geführt. Dieser kann dann nämlich mit dem schon entstandenen sekundären Amin **176** erneut zu einem Immoniumion kondensieren und zum tertiären Amin **177** reduziert werden. Dies führt allein schon aufgrund der Stöchiometrie allerdings auch dazu, dass mit jedem Molekül tertiärem Amin ein Molekül Edukt-Aminosäureester **173** entsteht. Dies erklärt die schlechten Ausbeuten dieser Reaktionssequenz. Ein zusätzlicher Nachteil liegt an dem benötigten sehr großen Überschuss der zwei teuren Reagenzien TFA und Triethylsilan auf einer sehr frühen Stufe des Syntheseweges zu einem Tetramat, weshalb dieser Weg nicht mehr verwendet wurde.

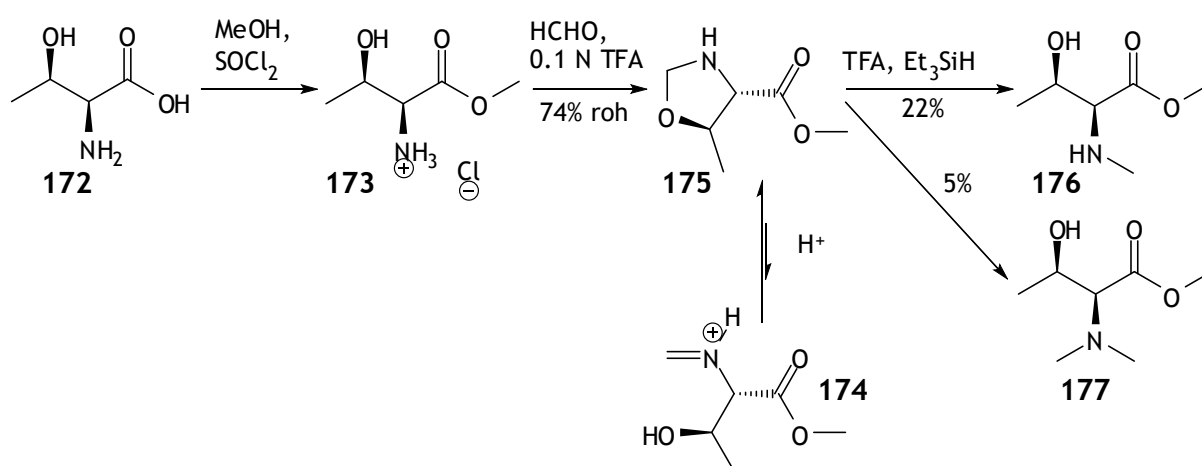


Abb.72: Darstellung von N-Methyl-threoninemethylester **176** durch reduktive Aminierung

Deshalb wurde zunächst der N-Boc-Threoninemethylester **178** PMB-geschützt. Im Basischen ließ sich auch die N-Methylgruppe einführen. Danach stellte sich allerdings heraus, dass unter mild sauren Bedingungen **179** und **180** samt Schutzgruppe solange unverändert blieben, bis es nach Erhöhung der Säurekonzentration zur Zersetzung kam.

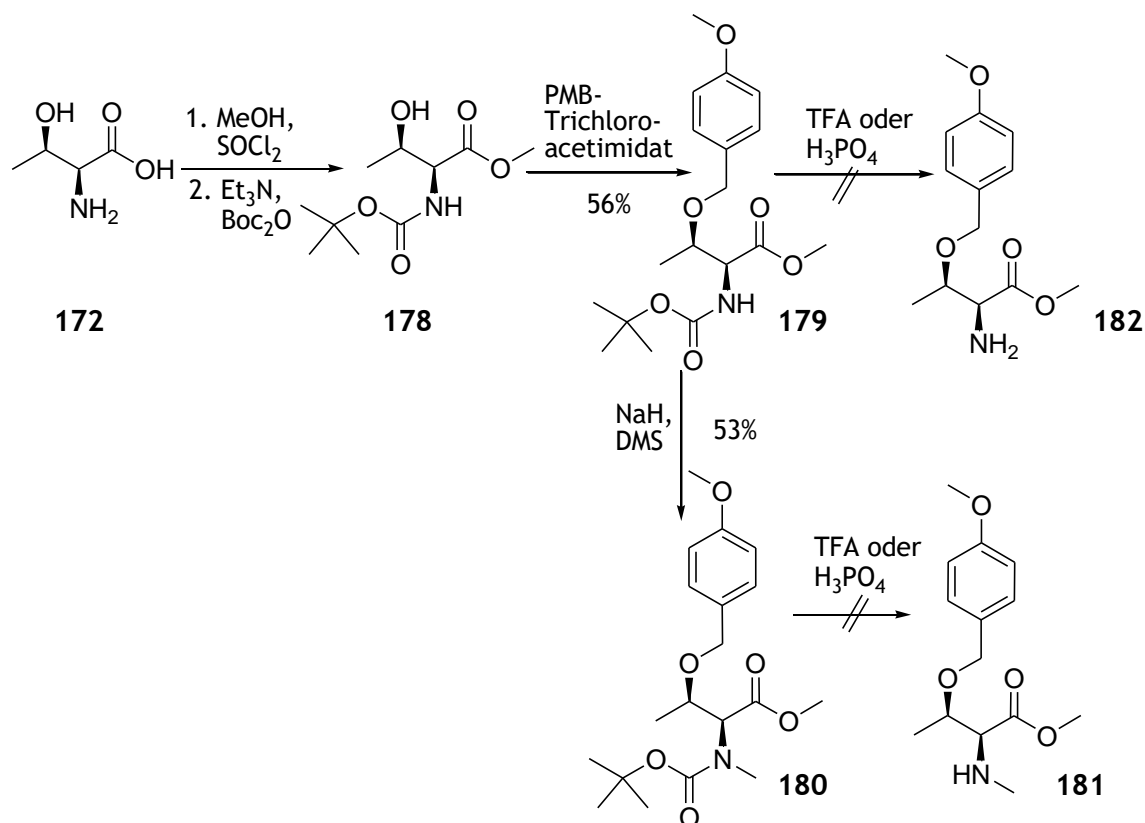


Abb. 73: erfolgreiche Erprobung der PMB- Schutzgruppe für die Threonin- Hydroxygruppe

Überhaupt stellte sich die Boc- Schutzgruppe als ungünstig für Threonin heraus, denn sie konnte auch später von **183** und **184** nicht ohne Zersetzung entfernt werden.

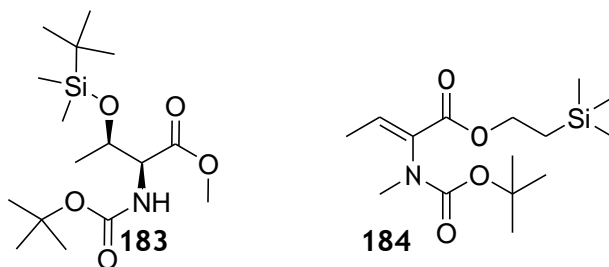


Abb. 74: Threoninderivate, von denen die Boc- Schutzgruppe nicht entfernt werden konnte

Die Acetalschutzgruppen waren auch ungeeignet, denn noch bevor Aminoester **185** auf dem DC vollständig verschwand, begann bei der THP-Schützung schon unter katalytisch sauren Bedingungen die auf dem DC leiterartig erkennbare Zersetzung. Mit Dimethoxy-methan schloß sich bei freiem Amin sofort das Oxazolidin **186**.

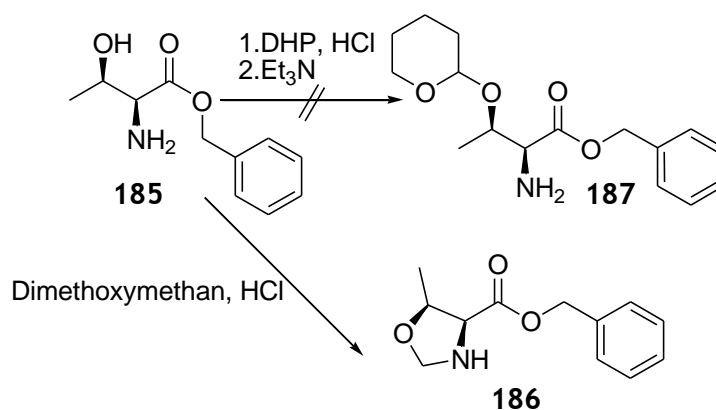


Abb. 75: Acetalschutzgruppen erwiesen sich als ungeeignet für die Threonin- Hydroxygruppe

Als nächstes wurden Silylschutzgruppen erprobt und es stellte sich heraus, dass sie zunächst einen deutlichen Vorteil besitzen: sie verwandeln die so polaren Aminosäuren in leicht handhabbare organische Verbindungen, die sich problemlos aus der Wasser-phase extrahieren und sehr sauber chromatographieren lassen. Dazu leistet der Benzyl-ester einen weiteren Beitrag. Da sich das Boc- Derivat **183** nicht entschützen ließ, wurde **172** als erster Schritt, unter Inaktivierung des Amins als Hydrotosylat, in den Benzylester **185** überführt, aus welchem sich der TIPS- geschützte Aminoester **188** erhältlich war.

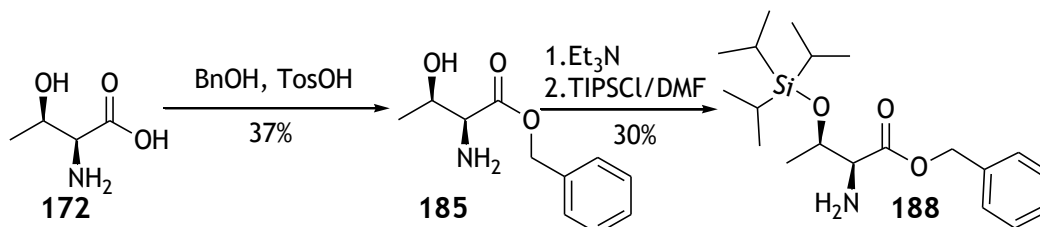


Abb. 76: Darstellung von **188** auf kurzem Wege

Obwohl sehr kurz, befriedigte diese Variante bei großen Substanzmengen wegen der geringen Ausbeuten nicht. Um die Silylierungseffizienz zu verbessern wurde das reaktivere Triflat eingesetzt. Was im kleineren Ansatz noch zu einer geringfügigen, aber aufgrund des höheren Preises für das Triflat auch nicht signifikanten, Verbesserung führte, entstand im größeren Ansatz, wahrscheinlich wegen der schlechteren Temperaturkontrolle, selektiv N-Silylverbindung **189**. Der Stickstoff konkurrierte nicht nur um die Silylgruppe, auch eine nachträgliche Verschiebung unter diversen Bedingungen erfolgte trotz der hohen Oxophilie des Siliciums nicht; wahrscheinlich wegen der sterischen Hinderung zwischen sekundärem Alkohol und drei Isopropylresten.

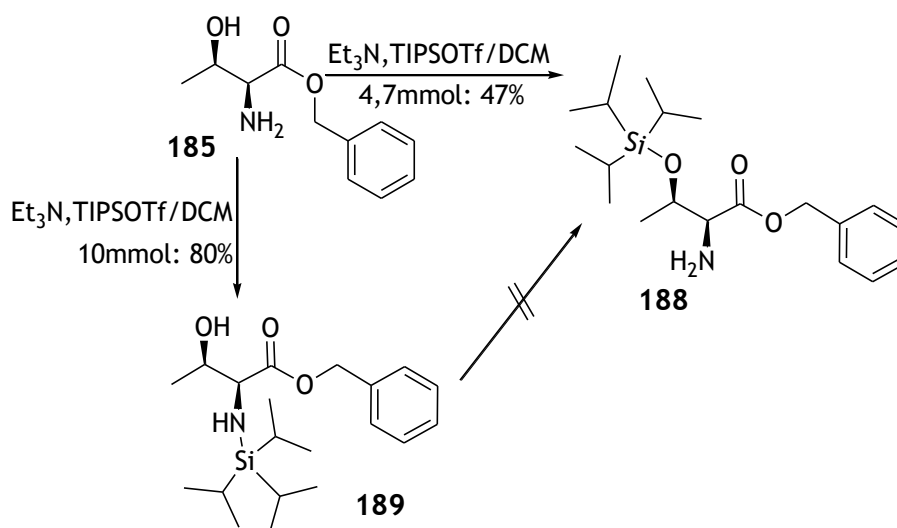


Abb. 77: ungünstige Silylierung von **185**

Also entschied ich mich, eine zusätzliche Schutzgruppe für den Stickstoff zu verwenden. Naheliegend war die Fmoc-Schutzgruppe, welche außerdem eine erhebliche Verbesserung der Ausbeute für die Veresterung ermöglichte. So entwickelte sich letztendlich die veröffentlichte Synthese zum Penicillenol C **12** (Abschnitt 4.3).

3.3.2 Eliminierung als Schlüsselschritt zu Penicillenol B

Bei der anschließenden Synthese der Penicillene B **11** versuchte ich zunächst die ohnehin für die N-Methylierung verwendete Nosylschutzgruppe auch für die Eliminierung zu verwenden, aber obwohl 3-O-Benzyl-, -Methyl- und -Silyl- Threoninderivate sowohl im Basischen, als auch im Sauren sehr schnell zur Eliminierung neigen, ist der O-,N-Dinosylester **190** eine erstaunlich stabile kristalline Verbindung, welche nicht in den ungesättigten Ester **191** überführt werden konnte.

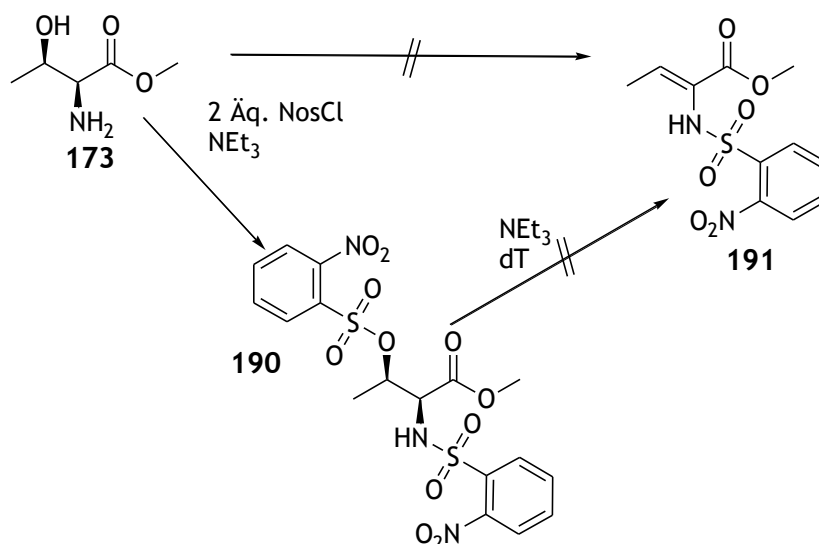


Abb. 78: Nosylierung am Threonin führt nicht zur Eliminierung

Da ich schon während der Diplomarbeit bei der Methylierung mit NaH/DMS Eliminierung beobachtet hatte, wollte ich das nun ausnutzen. Tatsächlich konnte ich in sehr guter Ausbeute in einer neuen Eintopf- Methylierungs- Eliminierungssequenz aus Boc-Threonin **192** das gewünschte Zwischenprodukt **193** auf dem Weg zu Penicillenol B herstellen.

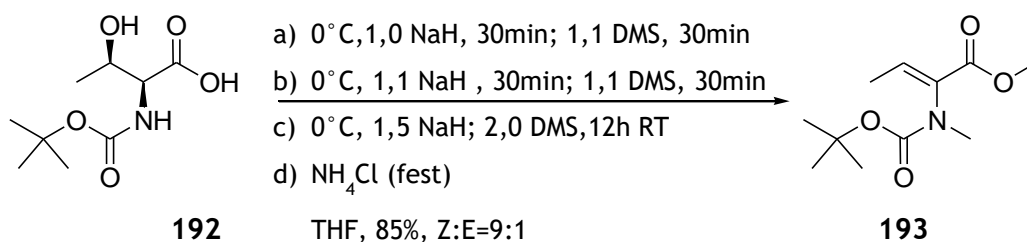
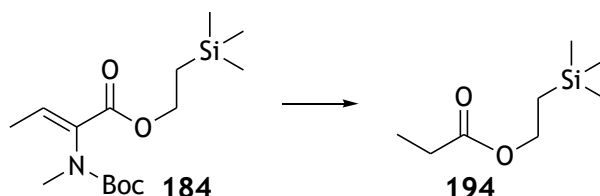


Abb. 79: neue Eintopf-Methylierungs-Eliminierungssequenz zum Aminocrotonester **193**

Um später eine milde Entschützung der Tetramate zu gewährleisten, wurde **193** in zwei Schritten schnell in den TMSE-Ester **184** überführt. Leider schlugen alle Versuche zur Entschützung desselben fehl. Stattdessen entstand das laut NMR vorgeschlagene Zersetzungsprodukt **194**.

Tabelle 4: Versuche zur Boc- Entschützung von **184**



	Bedingung	Ergebnis
A	4M HCl/ Dioxan, sauer einrotiert	194
B	2M HCl/ Dioxan, 45min, 0 °C, bas. extr.	194 + 184
C	1M HCl/ Dioxan, ü.N. RT	194
D	10% TFA/DCM; 1,5h; 0 °C	wenig 194 , viel 184
E	80µl conc. H ₃ PO ₄ , 160µL THF, (140mg 184)	Phasentrennung> keine Reakt.
F	E auf 1,5 mL THF verdünnt + 5% TFA	Nach 2h 184 + Zersetzung
G	80µl conc. H ₃ PO ₄ , 140µL Dioxan	ü.N. RT 184 stabil
H	G + 580 µL conc. H ₃ PO ₄	Nach 30min 194 + 184

Eine weitere oft beobachtete Reaktion war die Eliminierung während der Synthese des Tetramates. Also versuchte ich im Folgenden, diese auszunutzen. Da das leicht erhältliche eliminierte Benzyltetramat **195** jedoch nur unter präparativ aufwendigen Birch-Bedingungen

zu entschützen wäre, musste ein alternativer Ester gewählt werden. Methyl verlangt, wie schon erwähnt, eine aggressive Entschützung in conc.HCl und der TMSE-Ester kann nur mit bereits N-und O-geschütztem Threonin aus dem TMS-Ethanol hergestellt werden, welcher einerseits teuer ist und andererseits weitere Stufen zur zusätzlichen Schützung und N-Methylierung nötig sind. Also wurde das bisher noch nicht versuchte Allyltetramat **196** hergestellt.

Für eine Synthese im größeren Maßstab spielt die Atomökonomie eine wichtige Rolle. Da es auf die Dauer schmerzte, nur für die Einführung einer Methylgruppe, das Abfallprodukt **197** äquimolar wegzuwerfen, versuchte ich, eine alternative N-Methylierung ohne Nosylierung zu finden.

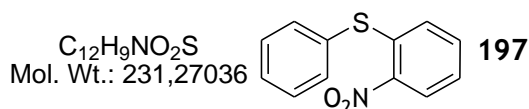


Abb. 80: äquimolar anfallendes Nebenprodukt **197** bei der Nosyl- Entschützung

Bei der unten dargestellten Sequenz wird **172** als erster Schritt selektiv in den Acetylesther **198** überführt. Dabei braucht man zwar auch eine zusätzliche Schutz-gruppe für die Methylierung, allerdings ist Acetylchlorid wesentlich leichter und billiger als Nosylchlorid.

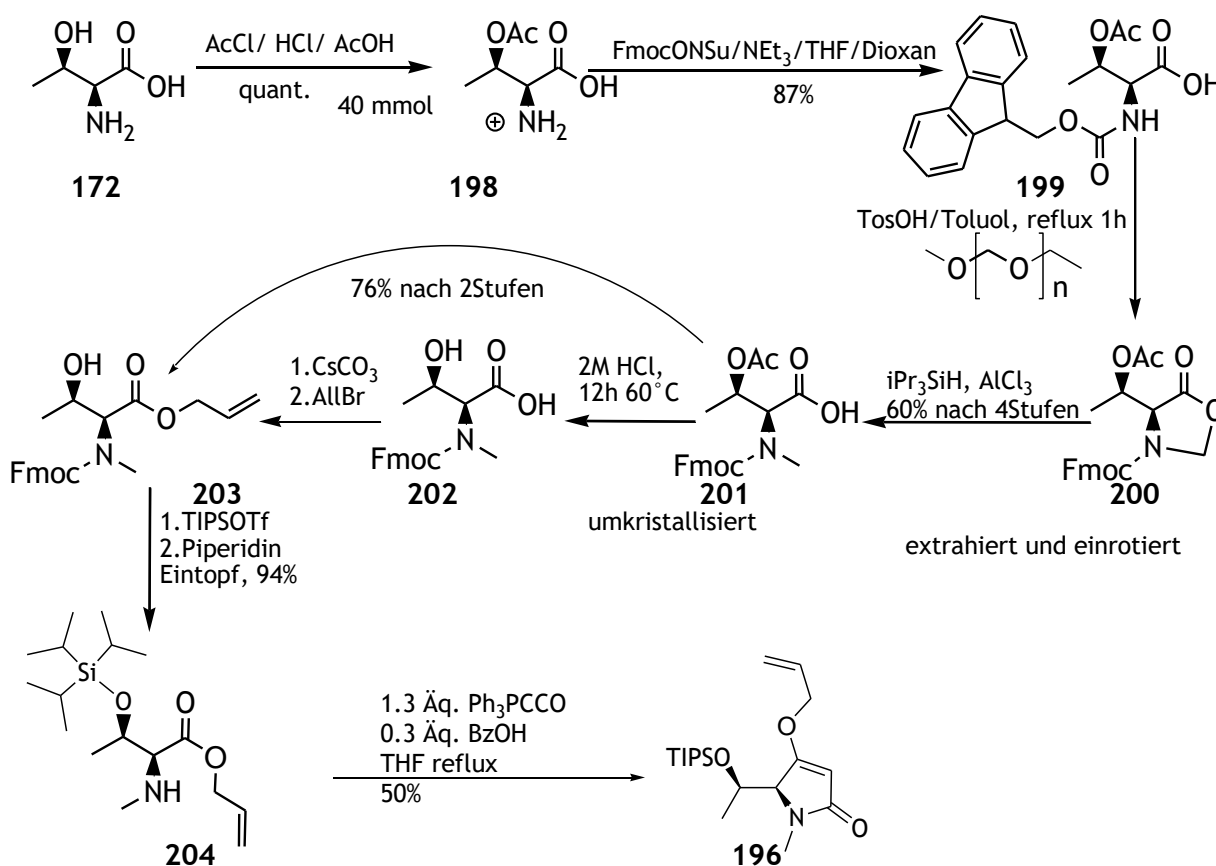


Abb. 81: Darstellung des Allyltetramates **196** aus **172** über Acetylierung und reduktiver Aminierung

Um bei der Cyclisierung gleichzeitig die diesmal erwünschte Eliminierung zu erreichen, wurden analoge Bedingungen wie beim Benzylester **205** gewählt, allerdings zeigte sich, dass stattdessen nicht O-TIPS, sondern leichter O-Allyl am 4-O eliminierte, wodurch das unerwünschte Bisacylylid **206** entstand.

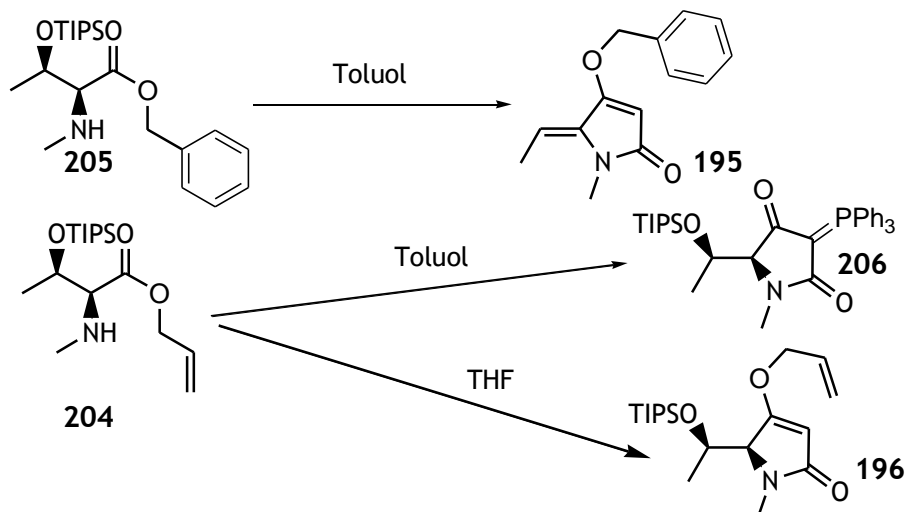


Abb. 82: unterschiedliche Eliminierung bei Dominosynthese von Benzyltetramat **195** und Allyltetramat **196** mit jeweils 1.3 Äq. Ph_3PCCO **43**, 0.3 Äq. BzOH

Da also leider die Eliminierung im Eintopf während der Zyklisierung im Säuren nicht erfolgte, führte ich diese als zweiten Schritt im Basischen durch. Zunächst konnte man im DC keinen Umsatz erkennen, weshalb sehr drastische Bedingungen gewählt wurden. Diese ließen außerdem aus dem Allyl- ein Vinylsystem **207** entstehen. Nachdem klar wurde, dass sich der R_f -Wert von **196** und **208** nur minimal unterscheiden (erst erkennbar durch Kreuztöpfeln), wurde die Reaktionskontrolle auch mit IR durchgeführt. Bei α,β -ungesättigten Estern kann man die Doppelbindung im Vergleich zur gesättigten Verbindung durch die zusätzliche Schwingung bei $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ erkennen; beim vorliegenden Allyltetramat **196** verschiebt sich die Amid-II- Bande nach Eliminierung von 1622 auf 1599 cm^{-1} . So konnte **208** schon nach 1h bei RT isoliert werden.

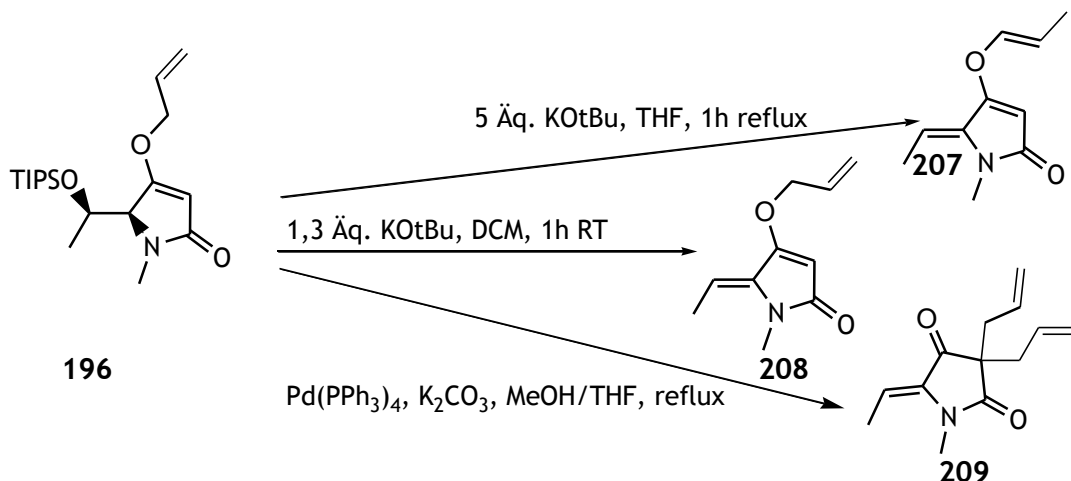


Abb. 83: basisch katalysierte Eliminierung von **196**

Da die Allyl-Entschützung sowieso im Basischen 24h unter Erhitzen verläuft, setzte ich direkt das TIPS-Tetramat ein. Wie zu erwarten, war bereits nach 4h das Edukt schon vollständig abreagiert (eliminiert) und nach 8h wurde aufgearbeitet. Leider führte die Reaktion unter Allyl-Umlagerung zum C,C-Diallyltetramat **209**, weshalb die Allylrouten verworfen und wieder der Benzylester verwendet wurde. Also blieb noch die Eliminierung als letzter Schritt, wie schon von Carsten Jagusch auf dem Weg zu den Agglomerinen⁵⁸ erarbeitet. Dies führte dann auch zu der erfolgreich publizierten Synthese (Abschnitt 4.4).

Einen sehr interessanten Effekt konnte ich nach der Fmoc-Entschützung zum N-Me,O-TIPS-Threoninbenzylester **205** beobachten. Da das Piperidin-Dibenzofulvenaddukt in großen Ansätzen leicht fest wird, Produkt einschließt und sich das Rohprodukt schlecht auf die Säule auftragen lässt, versuchte ich eine Grobabtrennung. Markus Petermichl hatte herausgefunden (mündl. Überlieferung), dass das Piperidin-Dibenzofulvenaddukt in Cyclohexan löslich ist und man einen Aminoester, der ein Feststoff ist, einfach abfiltrieren kann. Weil die silylierten Threoninderivate meistens Öle sind, versuchte ich eine Säure-Base-Extraktion, weil ich dachte, dass sich im Säuren der protonierte Aminoester vom cyclohexanlöslichen Nebenprodukt trennen ließe. Der Vorteil der TIPS-Schutzgruppe ist weiterhin ihre Stabilität, die eine solche Extraktion erlaubt. Als Säure verwendete ich wie häufig 0.5 M NaHSO₄-Lösung. Zu meiner Überraschung ließ sich der silylierte Aminoester **205** auch bei pH2 nicht in die Wasserphase extrahieren und blieb in der Cyclohexanphase. Glücklicherweise wurde umgekehrt das Piperidin-Dibenzofulven-addukt in die Wasserphase extrahiert, wodurch eine sehr gute Grobreinigung erreicht wurde.

3.3.3 Optimierung der Dominosynthese von Tetramaten mit Ph₃PCCO

Da meine Tetramsäuresynthesen als zentrale Cyclisierung die Domino-Addition-intra-Wittig-Reaktion mit Ketenylidetriphenylphosphoran **43** nutzen, versuchte ich, die Ausbeuten unter Variation von Reaktionsbedingungen und Reagentien zu verbessern. Als Testsystem wurden die Threonin-benzylester **188** und **205** verwendet.

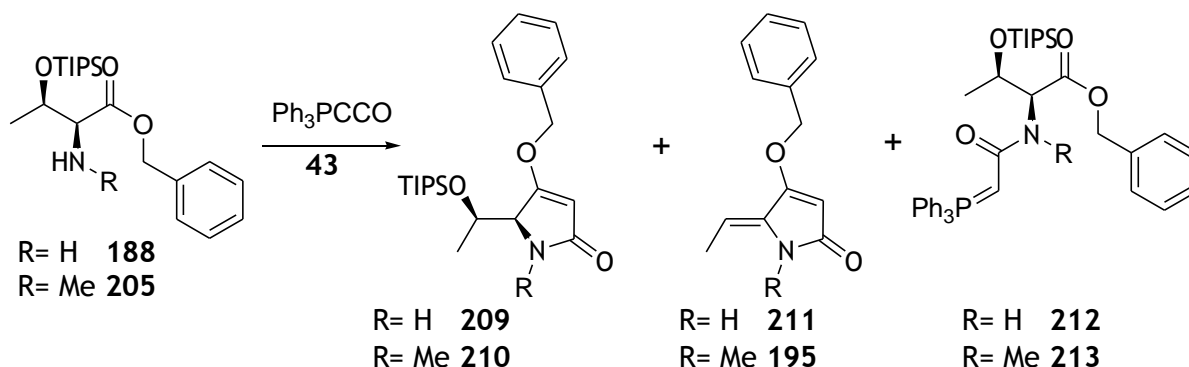


Abb. 84: Standardreaktion für Versuche zur Optimierung der Dominosynthese für Tetramate

Um die Vergleichbarkeit zu maximieren, führte ich oft 12 Versuche gleichzeitig mit unten gezeigter Apparatur aus. Diese erlaubt zentrales Begasen mit Argon, nutzt einen Magnetrührer, um den unteren Metallring zu erhitzen und leitet das Kühlwasser durch den oberen Metallring.

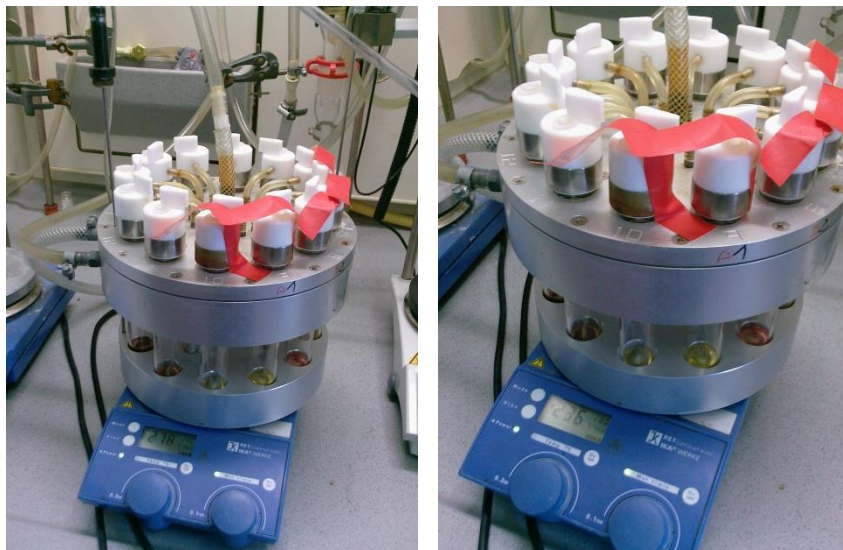


Abb. 85: Parallelreaktor, der erlaubt, 12 Reaktionen unter Rückfluss zu kochen

Schon die dünnschichtchromatographische Analyse verschafft einen guten Überblick über die qualitativen Einflüsse verschiedener Reaktionsbedingungen.

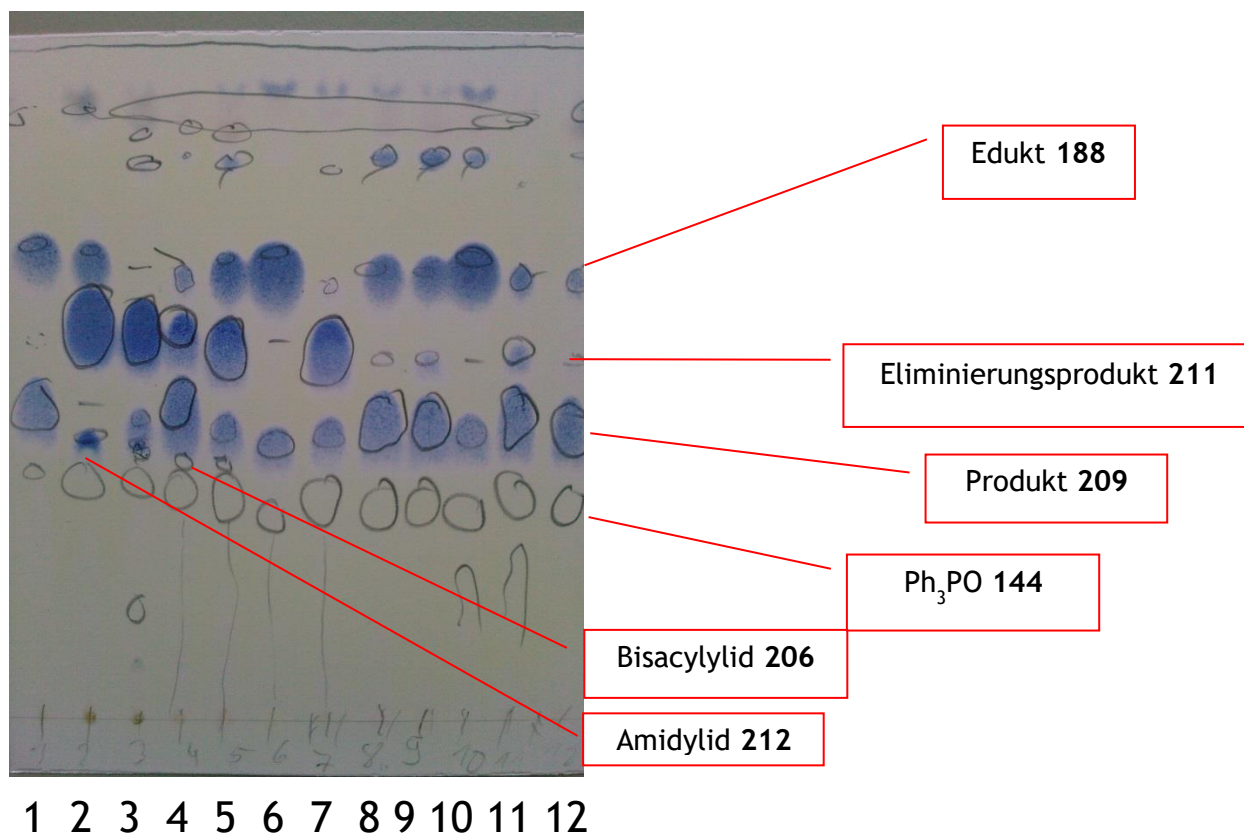


Abb. 86: dünnschichtchromatographische Analyse der Rohprodukte von der in Abb. 84 dargestellten Reaktion unter 12 verschiedenen Bedingungen (siehe Tabelle 5)

Tabelle 5: Reaktion laut Abb. 84; Oberhalb der fetten Linie R=H, unterhalb R=Me. In blau: Ansatznummer (Abb. 86)

Äq. Ph ₃ PCCO	LM-Art	LM-Menge (mL/mmol)		Äq. Katalysator	Elim.	Prod. (%)	Ed. (%)	Ansatz- größe (mmol)
1,1	Toluol	20	1	X	X	29		0,25
1,1	Toluol	20	2	0,1 BzOH	viel	X		0,25
1,3	Toluol	20	3	0,3 BzOH	viel	wenig	X	0,25
1,1	Toluol	20	4	0,05HOBt	~1:	1	wenig	0,25
1,1	Toluol	20	5	0,3HOBt	viel			0,25
1,1	THF	20	7	X	X		viel	0,25
1,3	THF	20	8	0,3 BzOH	viel		wenig	0,25
1,1	THF	20	9	0,05HOBt	wenig	42	27	0,25
1,1	THF	20	10	0,3HOBt	wenig	44	46	0,25
1,1	THF	20	11	0,1NHS	X		viel	0,25
1,1	Toluol	20	12	0,1NHS	wenig	63	wenig	0,25
1,3	Xylol (getrocknet vor fast 10Jahren)	20		X	wenig	45	wenig	0,25
1,3	Toluol	20		X	X	46	n.b.	0,25
1,1	Toluol	20		0,3 NHS; 0,1 DMAP	wenig	50	33	0,25
1,3	THF	14		0,3 BzOH	X	36	X	14,5
1,3	THF	15		0,3 BzOH	wenig	36	X	3,1
1,3	Toluol	11		0,01 BzOH	wenig	19	ja	2,1
1,1	Toluol	15		0,1NHS	X	27	70	13,2
1,1	Toluol	20		0,1NHS	X	20		5,5
1,3	Toluol	20		X		56		1,5
1,3	Toluol	12		X		20		12
1,3	Toluol	20		X		50		6,3

1,3	Toluol	40	X	kaum	41	X	2*0,5
1,1	Toluol	40	0,01 BzOH	X	46	40	2*0,5
1,1	Toluol	40	0,1NHS	X	40	32	2*0,5
1,1	Toluol	40	0,3 NHS; 0,1 DMAP	X	32	58	2*0,5
1,1	Toluol	40	0,1NHS; 0,01BzOH	X	45	34	2*0,5
1,3	THF	40,nach 12h 20	0,3 BzOH	X	48	45	1,24
1,1	THF	40	0,1 BzOH	X	46	viel	1,24
1,2	Toluol	15	0,05 BzOH	wenig	30	15	5
1,1	Toluol	40	X (Reakt.5 Tage!)	X	48	26	11,9
1,1	Toluol	40	X (Reakt.4 Tage!)	X	38	62	12,9

Tabelle 6: In weiteren Versuchsreihen wurde diese Reaktion für R=H auch in der Mikrowelle durchgeführt.

Äq. Ph ₃ PCCO	LM-Art	Katalysator	Temperatur	Dauer	Elim.(%)	Prod. (%)	Ed. (%)
1,3	Toluol	0,3 BzOH	reflux	15h	31	0	0
1	Toluol	0	reflux	15h	ja	Mischung	14
1,3	THF	0,3 BzOH	µW, 80°	1h	28	41	0
1	Toluol	0	µW, 90°	1h		15	viel
1,3	Toluol	0	µW, 120°	2*30 min	kaum	30	40
1,0; dann 0,5	Toluol	0	µW, 120°	30+30 min	kaum	28	47
1,1	Toluol	0,1 NHS	µW, 120°	60min	0	n.b.	viel
1,1	Toluol	0,1 NHS	µW, 120°	90min	deutlich	n.b.	deutlich
1,1	Toluol	0,1 NHS	µW, 150°	15min	kaum	32	deutlich
1,1	Toluol	0,1 NHS	µW, 180°	15min	kaum	39	deutlich

Ein Erklärungsversuch für den oft unvollständigen Reaktionsumsatz war, dass Ph_3PCCO **43** so langsam mit dem Amin reagiert, dass es schneller mit sich selber reagiert und sich zersetzt. Eine solche Dimerisierung ist bei einem dipolaren Reagenz natürlich möglich. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wurde versucht, Ph_3PCCO **43** zunächst an die Aminogruppe bei geringer Temperatur vorzuaddieren, bis im IR die Bande des cumulierten Systems bei 2100 cm^{-1} verschwunden sein sollte. Zu diesem Zweck wurde 5mmol Aminoester **205** in 78 mL Toluol gelöst. Die ersten 0,37 Äquivalente Ph_3PCCO **43** reagierten zwar nicht bei 50°C , aber bei Reflux nach 30 min deutlich und nach 15 weiteren Minuten fast vollständig ab. Die zweite ebensogroße Portion hatte allerdings auch nach weiteren 45min kaum angefangen zu reagieren.

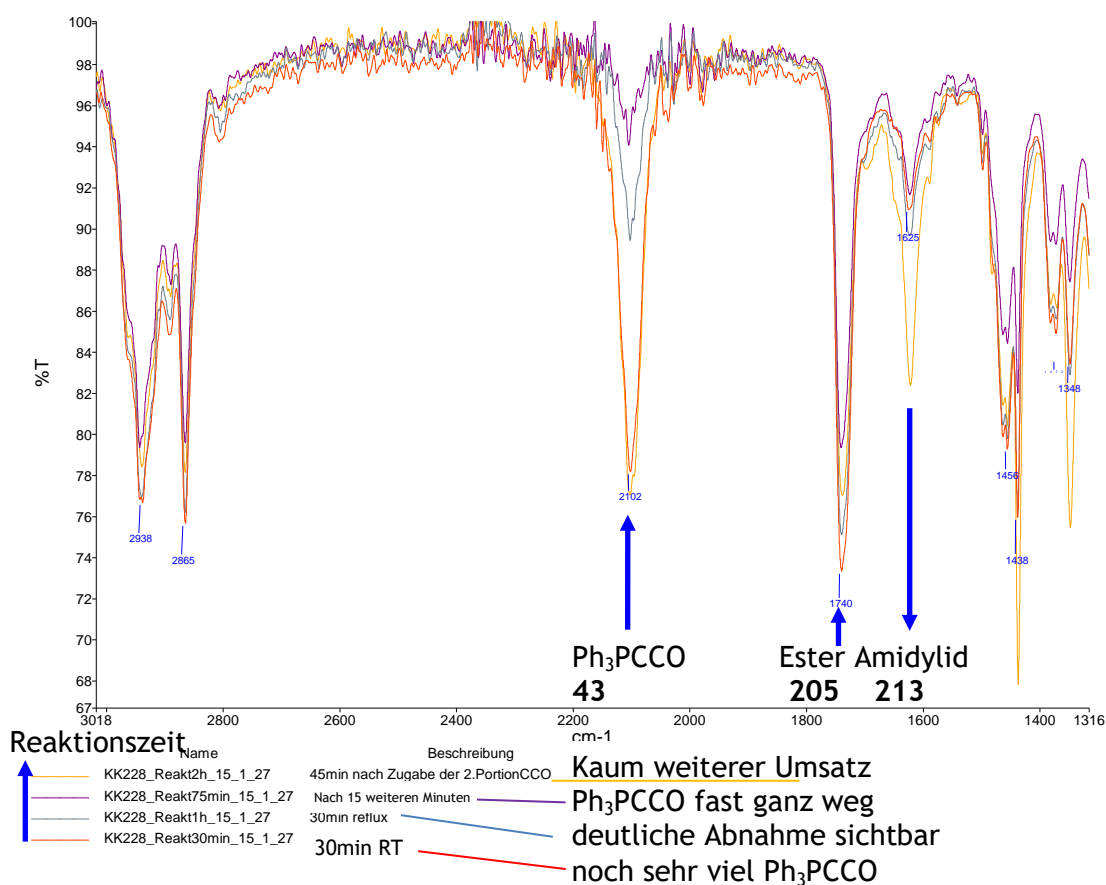


Abb. 87: IR- Analyse zur Reaktionskontrolle bei der Dominosynthese von **210** nach 30- 120 min

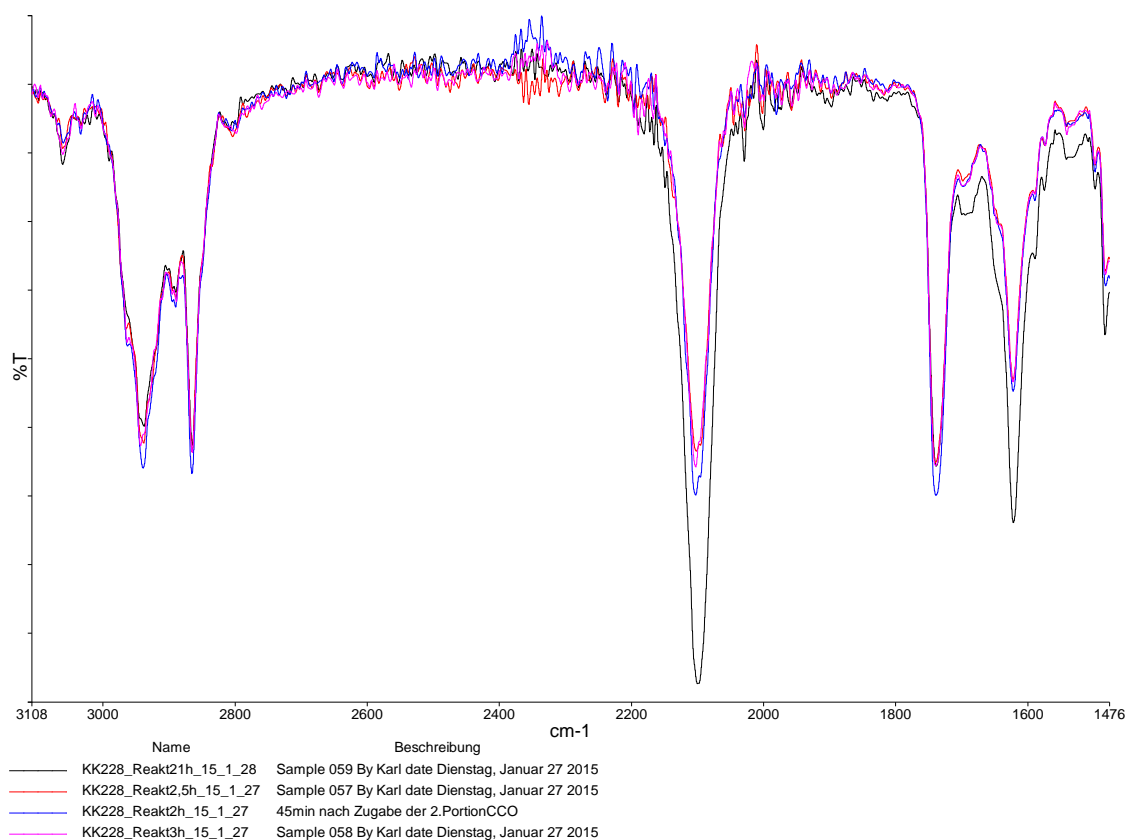


Abb. 88: IR- Analyse zur Reaktionskontrolle bei der Dominosynthese von **210** nach 2- 21 h

Betrachtet man den weiteren Reaktionsfortschritt, so fällt auf, dass ein minimales Fortschreiten zwischen 2 und 2,5h (blau und rot, Abb. 88) sichtbar ist, nach weiteren 30 min aber kaum (rosa). Also wurden die restlichen 0,3 Äq. Ph_3PCCO hinzugegeben und über Nacht gerührt. Nach 21h (schwarz) fällt zwar ein geringer aber nicht annähernd vollständiger Umsatz auf, da beide Edukte (Ester **205** + Ph_3PCCO **43**) noch nebeneinander vorlagen. Aus diesem Grund wurden 0,05Äq. Benzoessäure hinzugegeben. Nach nur 90min war Ph_3PCCO **43** vollständig abgereagert (rot, Abb. 89), aber erstens war noch Ester **205** vorhanden und zweitens war die Amid II-Bande (welche im Tetramat kleiner ist) wesentlich größer, als Amid I, was beides auf das Vorhandensein von Amidylid **213** schließen ließ, welches ja zudem auch eine Ester-funktionalität besitzt. Da nach weiteren 30 min (blau) kein weiterer Umsatz erkennbar war, wurde die Reaktionslösung eingeeengt und chromatographiert.

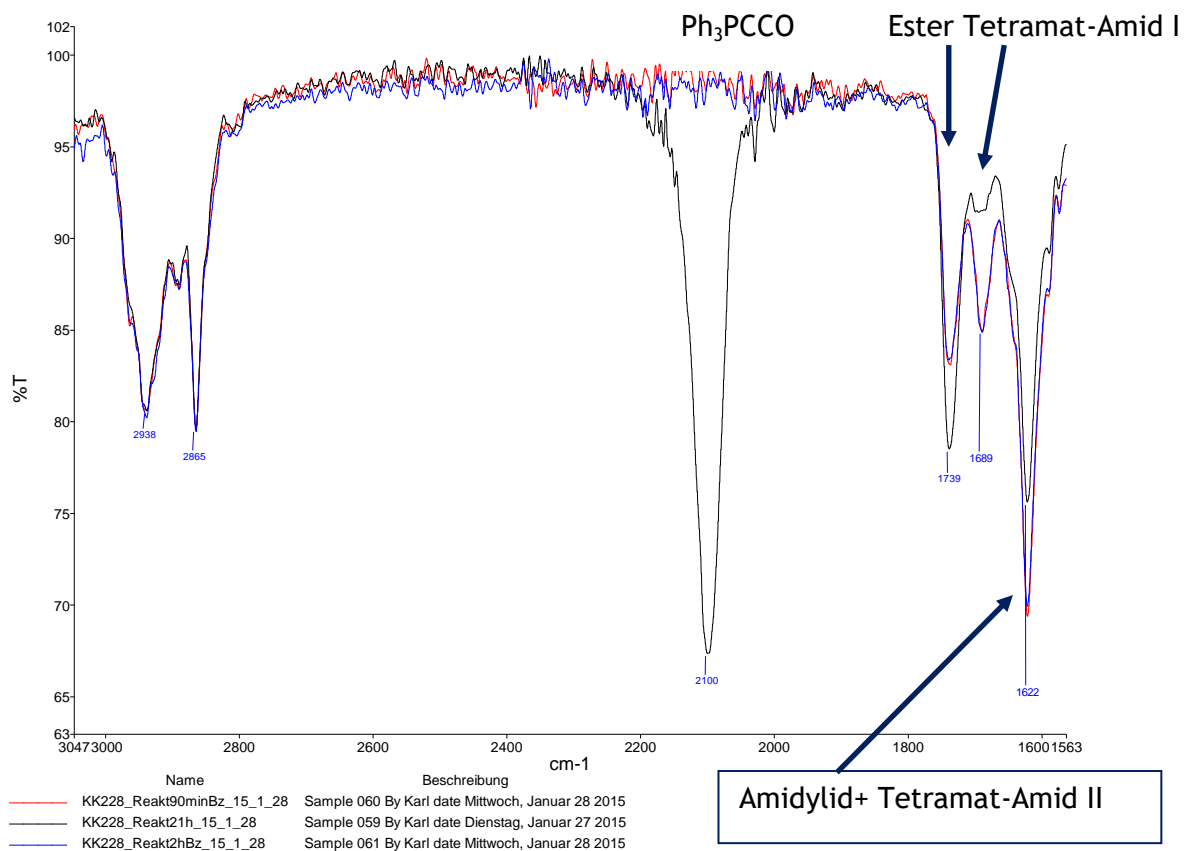


Abb. 89: IR- Analyse des Effektes der Zugabe von Benzoësäure auf die Dominosynthese von 210

Die Reinfraction lieferte hier nur 12% Produkt. Haupsächlich wurde mit 63% Edukt rückgewonnen. Die kleine Fraction des Amidylides 213 wurde als Mischfraction aus Tetramat (leicht apolarer) und Triphenylphosphinoxyd (polarer) isoliert.

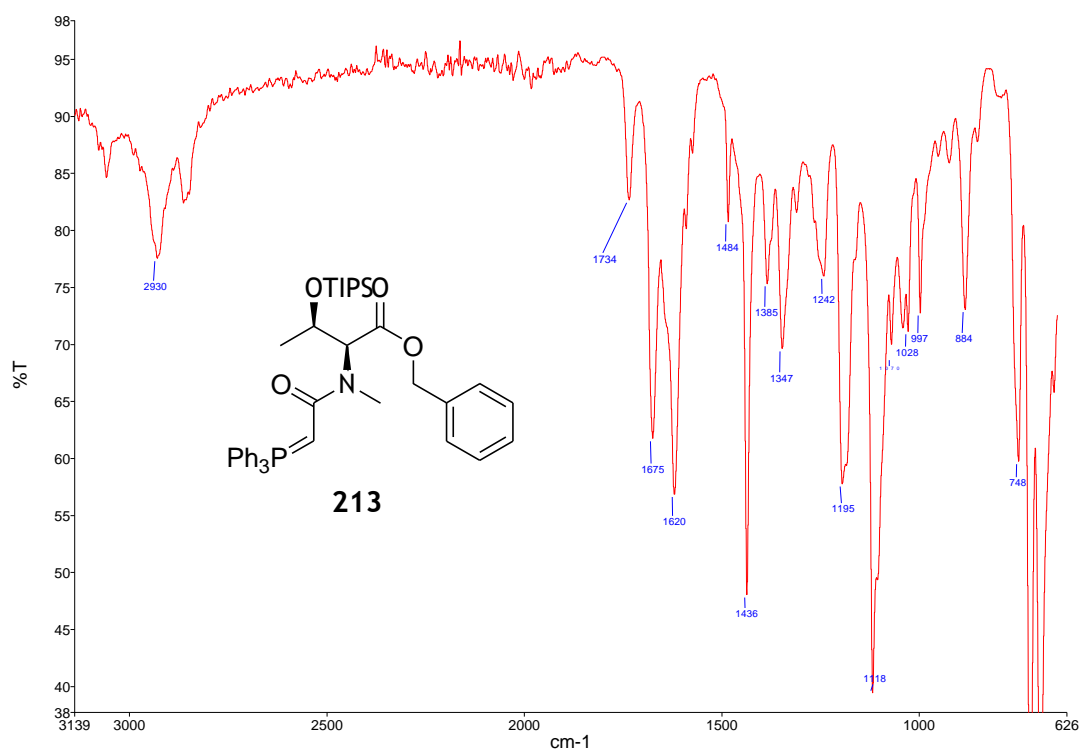


Abb.

90: IR- Spektrum des Amidylides **213**

Diese Mischung wurde in Toluol unter reflux gekocht und mittels DC auf Fortschritt untersucht. Da nach 3h kein Umsatz erkennbar war, wurde über Nacht weitergekocht. Danach war nur eine minimale Veränderung in der Intensität der drei Fraktionen zugunsten des gewünschten Tetramates sichtbar. Die säulenchromatographische Trennung allerdings lieferte nun eine ebenfalls nur leicht blau anfärbende Verbindung, welche minimal polarer war, als das Amidylid und deshalb vollständig vom Tetramat abgetrennt werden konnte. Sie konnte eindeutig als Bisacylylid **206** identifiziert werden, durch die charakteristische IR-Bande bei 1620 cm^{-1} , sowie die chemische Verschiebung im ^{31}P -NMR von $\delta=10\text{ppm}$. Dies zeigt, dass die Reaktion sehr wohl vollständig abgelaufen war, nur eben zum Teil **206** als Nebenprodukt entstanden war, obwohl keine Säure mehr in der Reaktionslösung vorhanden war. Die analogen Reaktionen mit dem Phenylalanin- Methylester **138** und dem Threonin-Allylester **204** hatten gezeigt, dass vermehrte Bildung von Bisacylylid unter Zugabe von 0,3Äq. Benzoësäure entstand.

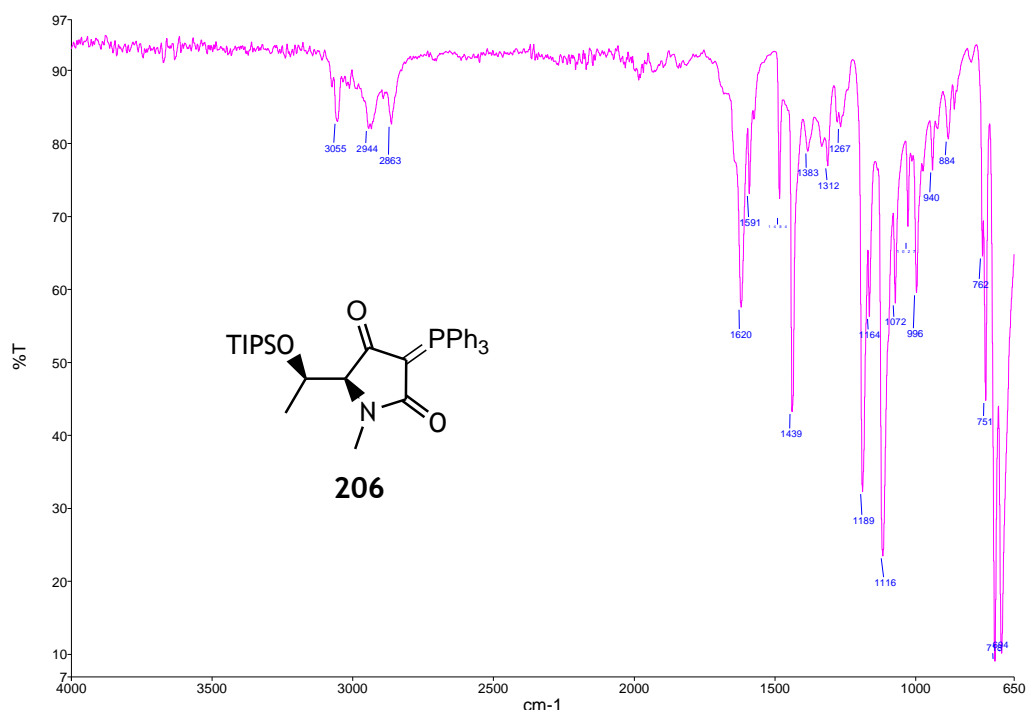


Abb. 91: IR- Spektrum des Bisacylylides **206**

Nachdem beim letzten Versuch klar wurde, dass Ph_3PCCO ohne Benzoësäure auch über Nacht nicht abreagierte, setzte ich in einem neuen analogen Versuch, nachdem 90 min reflux mit 0,37Äq. Ph_3PCCO im IR noch kaum reagieren ließen, gleich 0,05 Äq. Benzoësäure zu. Nach weiteren 40 min war Ph_3PCCO abreagiert und ich gab erneut 0,37Äq. davon zu. Nach einer weiteren Stunde war auch diese Portion abreagiert und ich gab die letzte Portion hinzu. Als nach weiteren 2,5h noch viel Ph_3PCCO übrig war, ließ ich die Reaktion über Nacht kochen. Nach 24h war allerdings immer noch viel Ph_3PCCO übrig, deshalb gab ich erneut 0,05 Äq. Benzoësäure zu. Nach nur einer weiteren Stunde war alles umgesetzt und die Lösung eingeeengt und chromatographiert. Leider hatte sich der Aufwand wieder nicht gelohnt, da das Produkt **210** nur in 31% und das Edukt **205** in 50% isoliert wurde. Offensichtlich reagiert Ph_3PCCO auch bei im Überschuss vorhandenem Aminoester besser mit sich selber ab.

Aus all diesen Versuchen lässt sich folgendes Muster erkennen:

- Mit 30% Benzoësäure reagiert Ph_3PCCO **43** zwar vollständig ab, allerdings bewegen sich die Ausbeuten bei nur ~35% und die Bildung von Eliminierungsprodukten wie Alken und Bisacylylid wird gefördert. Wenig Aminoester kann rückgewonnen werden.
- Mit 5% Benzoësäure reagiert Ph_3PCCO deutlich langsamer ab, aber es tritt kaum Eliminierung auf. Die Ausbeuten liegen bei ~30%, aber ~40% Aminoester kann rückgewonnen werden.
- Ohne Benzoësäure reagiert Ph_3PCCO auch in kochendem Toluol sehr langsam und nie vollständig. Die Ausbeuten liegen bei ~50%, aber der Substanzverlust ist minimal, denn knapp 50% Aminoester kann rückgewonnen werden.

Also blieb nach dem hohen Maß an Substanzrückgewinnung bei geringem Umsatz noch die Frage, ob eventuell ein entstehendes Nebenprodukt die Reaktion zum Erliegen bringt, oder nur die Geschwindigkeit so gering ist. Zur Klärung dieser Frage wurde die Reaktion erneut in Toluol ohne Benzoessäure gekocht. Die folgende IR-Analyse (Abb. 92) fördert verblüffenderweise zutage, dass auch nach 5 Tagen kochen noch deutlich beide Edukte **43** und **205** nachweisbar sind! Die nur intermediäre Zunahme der Amid-II-Bande bei 1622 cm^{-1} ist der fortschreitenden Abnahme des Amidylides **213** geschuldet. Allerdings war die Rückgewinnungsrate nach 5 Tagen durch die lange thermische Belastung etwas geringer (siehe Tabelle 5). Ein analoger Test nach 4 Tagen zeigte, dass zwar die Umsetzung nur 38% statt 48% betrug, aber basierend auf rückgewonnenem Edukt eine Ausbeute von 100% erreicht wurde.

Das bedeutet, dass hiermit ein Zeitoptimum dieser langen Reaktion gefunden werden konnte.

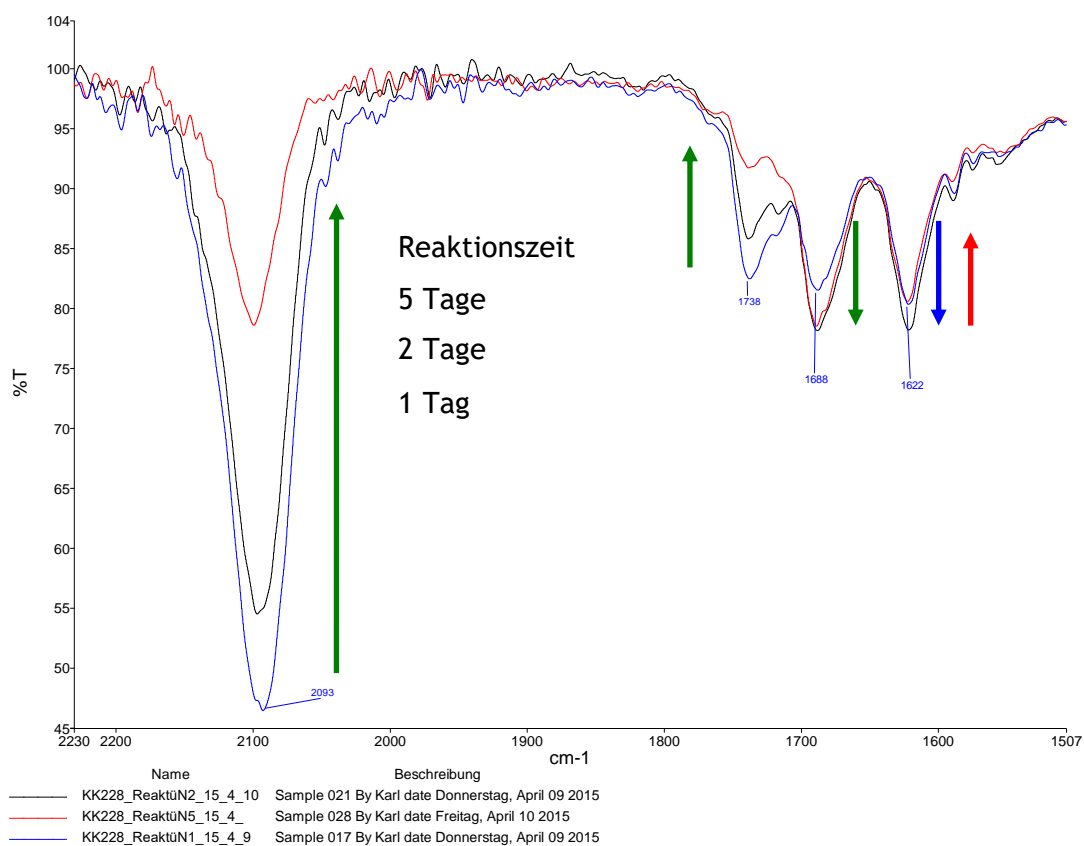


Abb. 92: IR- Analyse zur Reaktionskontrolle bei der Dominosynthese von **210** nach 1- 5 Tagen; grüne Pfeile: Abnahme der Edukte **43** und **205** bzw. Zunahme von **210**; blauer/roter Pfeil: Zunahme von **213** nach 2 Tagen und Abnahme nach 5 Tagen

3.3.4 Synthese der Seitenkette von Penicillenol C

Die Retrosynthese der Seitenkette wurde zunächst entworfen, wie in Abb. 93 dargestellt. Dabei sollte Alken **214** aus dem Aldehyd **215**, und Ylid **216** erhalten werden. Der α -Methylester **217** konnte schnell durch Hydrierung des Alkens **218** erzeugt werden, welches das Produkt darstellt aus der Wittigreaktion des α -methylierten stabilisierten Ylids **219** mit γ -Butyrolactol **163**.

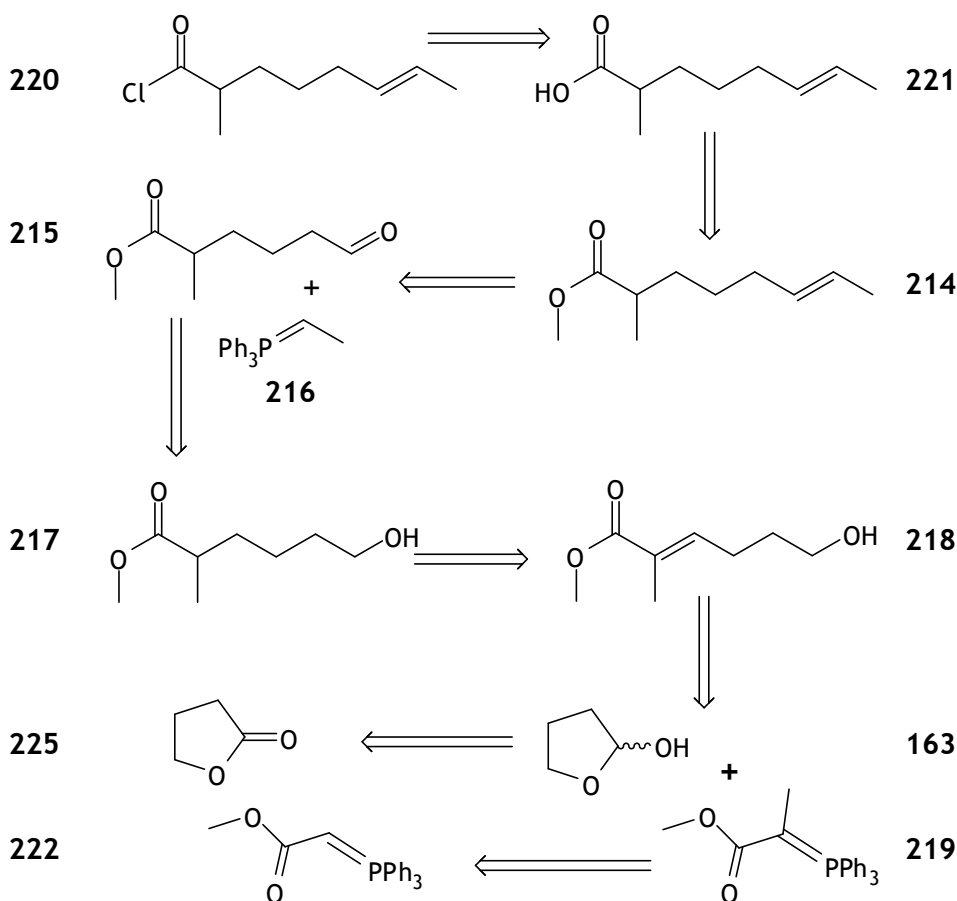


Abb. 93: geplante Retrosynthese des ungesättigten Acylchlorides **220** zur Darstellung von Penicillenol C₁ **12**

222 kann leicht in zwei Stufen aus kommerziell erhältlichem Bromessigsäure-methylester und Triphenylphosphin erhalten werden. Die Methylierung mit Methyljodid kann so geführt werden⁵⁹, dass zu 80 % einfach methyliertes Phosphoniumjodid **223** entsteht, wie in Abb. 94 gezeigt. Die Überführung in das Ylen **219** erfolgt wie auch bei **222** in wässriger Natronlauge und **219** kann durch Umkristallisieren nach vier Schritten in einer Ausbeute von 54 % erhalten werden.

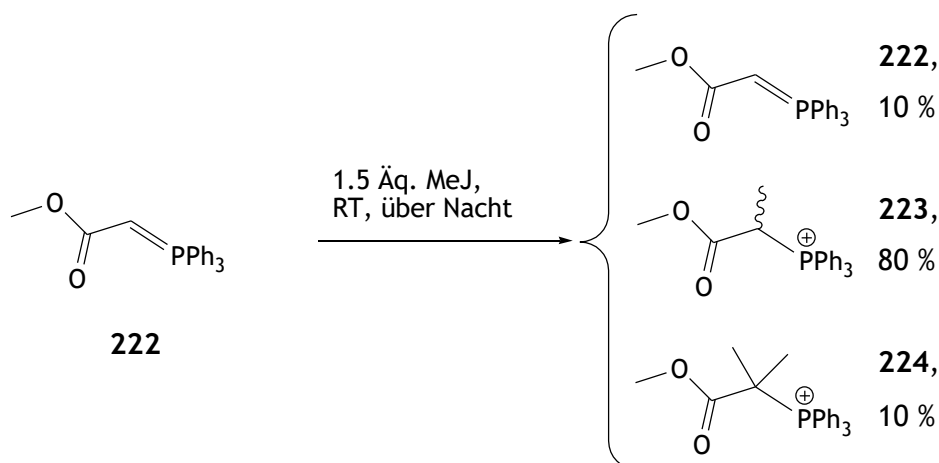


Abb. 94: Methylierung von Carbomethoxymethyltriphenylphosphoran **222** mit Methyljodid

Bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung von **219** fällt auf, dass die Atomkerne in CDCl_3 unterhalb der Koaleszenztemperatur von 55°C zwei Signalsätze liefern⁶⁰. Dies liegt daran, dass das Phosphoratom im Ylen nicht planar, sondern tetraedisch koordiniert. Bei Temperaturen unter 25°C erfolgt keine Rotation über die am Kohlenstoffatom sp^3 -hybridisierte Ylidform, so dass zwei diskret unterscheidbare Rotationsisomere im Verhältnis von 40 % zu 60 % in Lösung vorliegen.

Die Reduktion von γ -Butyrolacton **225** zum γ -Butyrolactol **163** mit Diisobutylaluminiumhydrid liefert als Nebenprodukte auch die Acetale des Lactols mit der Hydroxylgruppe der offenkettig vorliegenden Form des Aldehydes bzw. mit überreduziertem Diol. Lässt man die Reaktionslösung auf Raumtemperatur kommen und weiterrühren, entsteht vor allem letzteres Produkt. Setzt man **225** im Überschuss ein, so bildet sich der Ester aus offenkettigem **225** und der Hydroxylgruppe von offenkettigem **163**. **163** kann zwar destilliert werden, die Acetale lassen sich so allerdings nicht vollständig abtrennen. Erst eine starke Verdünnung der Reaktionslösung auf 300 mL DCM auf 70 mmol **225** und Verkürzung der Reaktionszeit auf 90 min steigerten die Ausbeute auf 94 % Rohprodukt **163**, in dem die Acetale nur etwa 3 % ausmachten, was per NMR-Messung bestimmt wurde. Das Rohprodukt **163** wurde dann mit **219** zur Reaktion gebracht, wodurch man **218** nach säulenchromatographischer Reinigung in 76 % Ausbeute erhielt. Die Synthese von **217** wurde zum Testen der Reaktionen für die erste Synthese von Penicillenol C₁ **12** racemisch durchgeführt. So wurde **217** nach katalytischer Hydrierung unter Wasserstoff-atmosphäre quantitativ erhalten.

Im weiteren Syntheseverlauf wurde **217** mit Pyridiniumchlorochromat zum Aldehyd **215** oxidiert.

Um **214** als reines E-Olefin zu erhalten, wurde die Schlosser-Variante der Wittig-Olefinierung verwendet, wie in Abb.51 dargestellt. Zuersteinmal wird Ylen **216** mit einer Lithiumbase erzeugt, damit nach Addition von **216** an den Aldehyd **215** die Lithiumionen das Oxyanion so fest koordinieren, dass es nicht am Phosphoniumion angreifen kann. So wird die Bildung des Phosphooxetans als die für die Wittig-Reaktion typische Zwischenstufe verhindert. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, das im ersten Schritt als zufällig verteiltes Isomerengemisch vorliegende Phosphoniumsalz **226** zum Ylen **227** zu deprotonieren, woraus der Verlust des Stereozentrums resultiert. Im folgenden Schritt wird **227** mit einem sterisch anspruchsvollen Protonendonator, hier *tert*Butanol, reprotoniert. Dies erfolgt jeweils von der Seite des Ylens, die dem positiv geladenem Lithiumion bzw. dem Oxyanion, welches es koordiniert, abgewandt ist. Deshalb entstehen aus racemisch vorliegendem Ylen beide möglichen erythro- Isomere von **226**. Nach Zugabe von Kaliumionen, die keine so stark koordinierenden Eigenschaften besitzen, kann die Wittig-Reaktion in bekannter Weise ablaufen. Ohne Konfigurationsveränderung an den Stereozentren kommt es nun zur Bildung des Phosphooxetanes und nach Eliminierung von Triphenylphosphinoxid zur Entstehung des E-substituierten Olefines **214**.

Wahrscheinlich wegen des [unerwünschten Angriffes](#) des Ylidanions **227** auf das Estercarbonyl lieferte die oben dargestellte Reaktion **214** nur in sehr geringer Ausbeute von 14 % und viele Nebenprodukte, welche im ¹H- NMR- Spektrum jeweils die Methylestergruppe vermissen ließen und dafür zu viele olefinische Protonen aufwiesen. Die Identität des Produktes konnte aber durch H-NMR und MS bewiesen werden und die GC-MS- Analyse zeigte nur ein Produkt, weshalb wie gewünscht kein Isomerengemisch entstanden sein sollte.

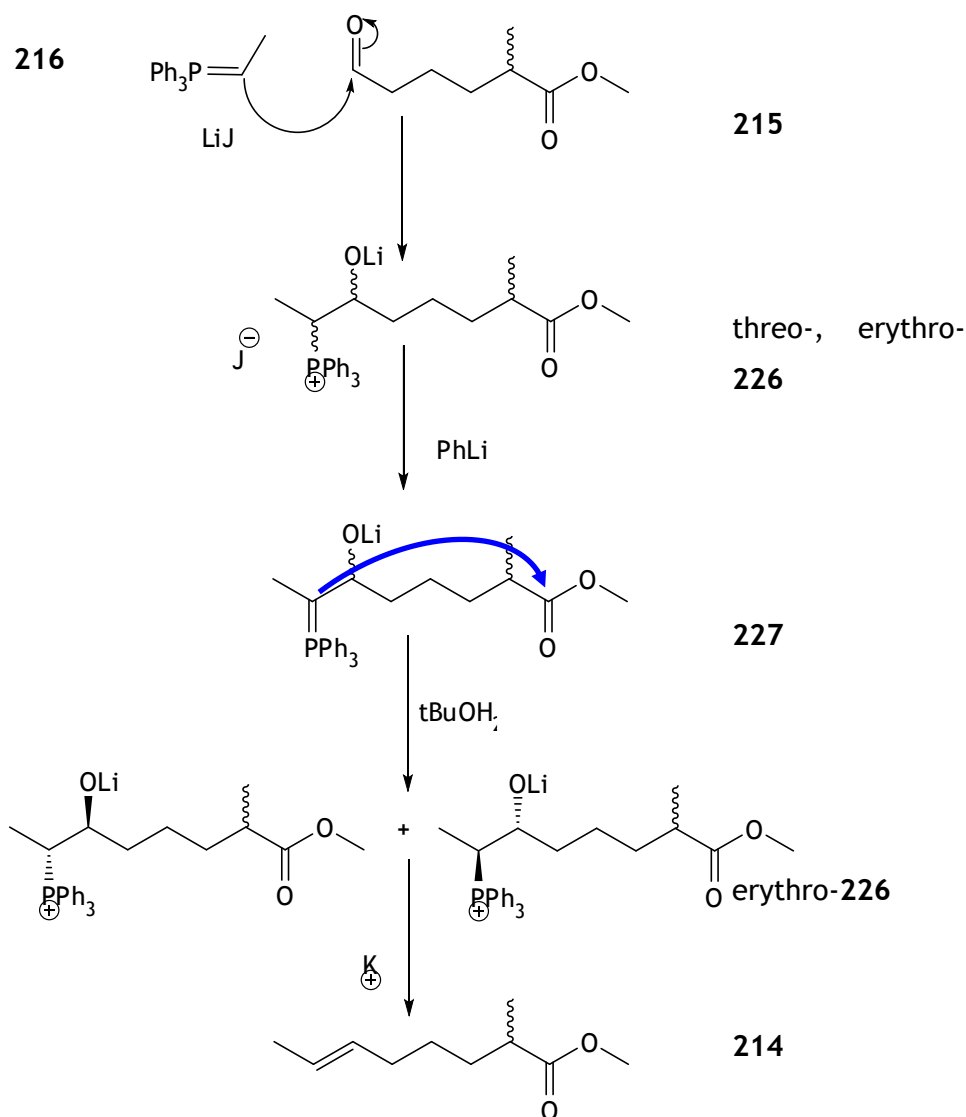


Abb.95: Mechanismus⁶¹ der Schlosser-Wittig-Reaktion zur E-selektiven Synthese von 214, unerwünschte (inter- oder intramolekulare) Nebenreaktion

Daneben existieren noch andere Reaktionen, um Aldehyde E- selektiv zu olefinieren, beispielsweise die Julia-Lythgoe- Reaktion, die statt eines Phosphorylens ein Sulfon verwendet. Phenyl-tetrazolyl- Sulfon 228 ließ sich in guten Ausbeuten aus dem Phenyl-tetrazolyl- Thiol durch Veretherung (87%) und anschließender Oxydation (85%) darstellen⁶²; allerdings lieferte die Umsetzung mit dem Aldehyd 215 (Abb. 96) erstens hauptsächlich das unerwünschte Z-214 (in nur 20% Ausbeute) und zweitens eine große Menge des Nebenproduktes 229 aus der Reaktion eines Sulfon-ylides 230 mit einem zweiten, noch nicht deprotonierten, Sulfon 228.

Aus diesen Gründen wurde die gesamte Strategie verworfen. Da zu diesem Zeitpunkt die alkinterminierten Seitenketten für die Klick-Markierung (siehe Abschnitt 3.1.3) bereits in hervorragender Ausbeute von mir dargestellt wurden, konnte eine neue Route über Birch-

Reduktion des Alkines entwickelt, ohne Probleme fertiggestellt und publiziert werden (Abschnitt 4.3).

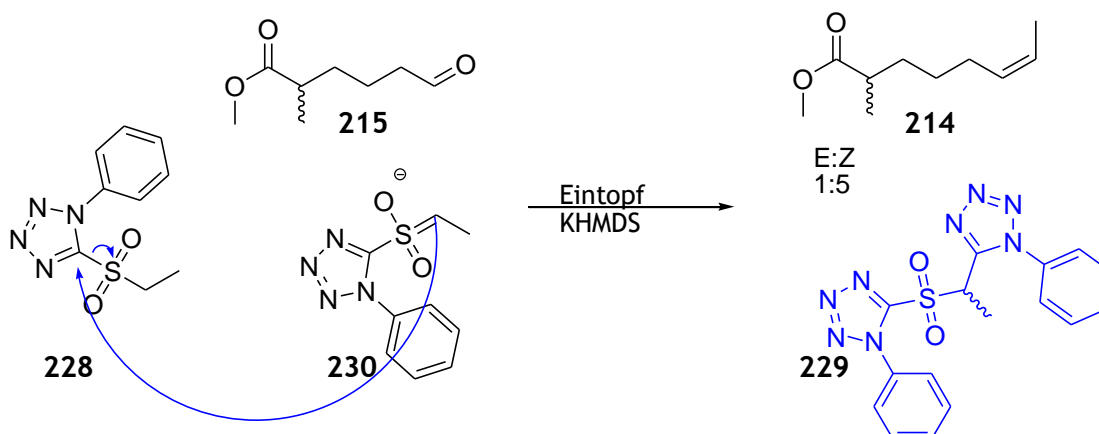


Abb. 96: Julia-Lythgoe- Olefinierung von **215** mit unerwünschter Reaktion zu Nebenprodukt **229**

3.3.5 Synthese von Decalinoyltetramsäuren

Der Schlüsselschritt in der von mir angewendeten modularen Synthese von 3-Acyltetramsäuren ist die Acylierung der fertigen Tetramsäure mit einer Carbonsäure. Mit allen bisher verwendeten Kondensationsreagentien (DCC, gemischtes Anhydrid mit Kohlensäureester, T_3P , Säurechlorid) bildeten sich immer die 4-O- Acyltetramsäuren, welche sich im Falle von α -unverzweigten Acylresten unter verschiedenen Bedingungen (NEt_3 /reflux⁴⁹, $CaCl_2$ /DMAP/RT³⁹, Acetoncyanhydrin⁶³ usw.) zu den analogen 3-Acylverbindungen umlagern lassen. Bei der Synthese der Penicillenole mit ihrer α -Methylseitenkette musste für einen vollständigen Umsatz die DCM- Lösung ($CaCl_2$ /DMAP) noch einige Stunden gekocht werden.

Mein Kollege Markus Winterer hatte auf dem Weg zu Methiosetin bereits die Decalinsäure **248** und damit die 4-O-Acyltetramsäure **231** hergestellt (Abb. 97). Nach vielen erfolgreichen Versuchen zur Umlagerung überließ er mir die restliche Menge **231**, sowie Decalinsäure. Meine vier ersten Versuche sind in Tabelle 7 dargestellt.

Die in Abb. 97 angedeutete (auf HPLC untrennbare) Mischung mehrerer Diastereomere von **232** entsteht nur in geringem Maße durch Epimerisierung während der Umlagerung, sondern umgekehrt findet die Umlagerung offenbar nur bei Diastereomeren statt, deren Säurecarbonylkohlenstoffatom weniger stark sterisch gehindert ist. Dies könnten die *trans*-substituierten Derivate sein.

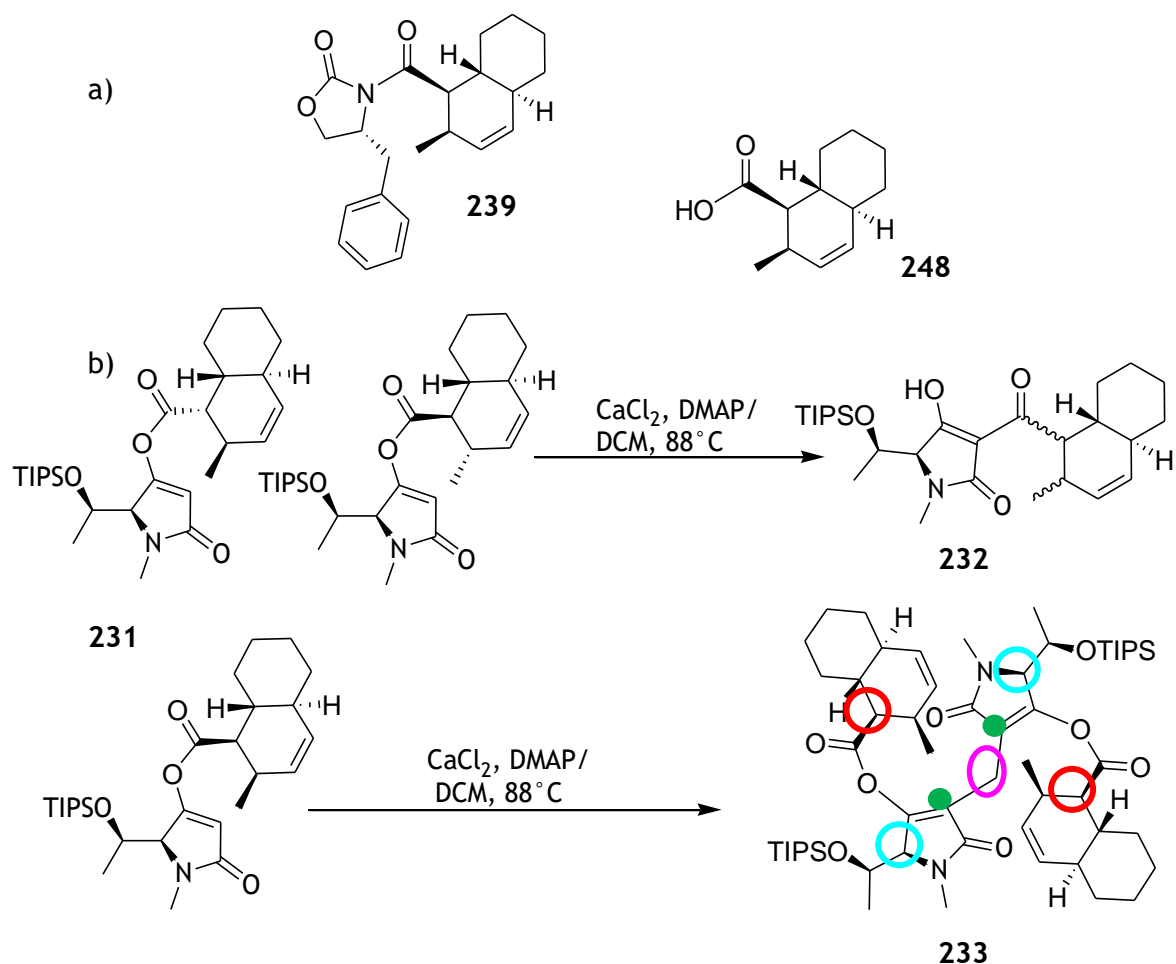


Abb. 97: a) Edukt für die Darstellung der 4-O- Acyltetramsäure **231**: Octalinsäure **248** synthetisiert von Markus Winterer⁶⁴ durch stereoselektive IMDA- Zyklisierung mittels Evans- Auxiliär zu **239**;

b) Einfluss der Stereochemie auf die Reaktivität von **231** und mögliche Struktur des Dimeres **233**; farbig markiert sind Atomgruppen mit charakteristischer Verschiebung in den folgenden NMR- Spektren.

Tabelle 7: Versuche zur Acyl- Umlagerung von 231

Versuch	Edukt	Durchführung	Ergebnis
1	231 von Markus	Rückfluss in DCM	Spuren von 232 (mehrere Isomere)
		Rückfluss in	Keine weitere Umsetzung (wahrscheinlich weil Dichloroethan zu nass)
	Nach Extraktion mit EDTA	88 °C DCM im Bombenrohr	Vollständiger Umsatz 232 (mehrere Isomere)
2	239 Reinfraction (Abb. 97)	Gleich 88 °C DCM im Bombenrohr	Vollständiger Umsatz 233, teilw. TIPS-OH-Eliminierung
3	239 Mischfraktion (Isomere nach unselektiver therm. Zyklisierung)	10 Tage RT	Spuren von 232 (mehrere Isomere)
	Dieselbe Lösung	88 °C DCM im Bombenrohr	Vollständiger Umsatz 232 (mehrere Isomere)
4	239 Reinfraction	3 Tage RT ohne DMAP, 80 °C DCM im Bombenrohr	Keine Umsetzung
	Dieselbe Lösung, mehr CaCl ₂ , DMAP	88 °C DCM im Bombenrohr	Vollständiger Umsatz 233

Erst 2014 hat Yoda⁶⁵ Dimere von freien Tetramsäuren aus Knoevenagel- Kondensation von Aldehyden an eine Tetramsäure und nachfolgender Michael- Addition derselben Tetramsäure stereoselektiv dargestellt. Desweiteren sind sogar kürzlich analoge Naturstoffe entdeckt worden, die aus der dimerisierten freien Tetramsäure des eliminierten Threonins bestehen⁶⁶. Aufgrund folgender Charakteristika postuliere ich für das unerwartete Produkt **233** die in Abb. 97 dargestellte Struktur.

- **Masse spricht für ein Dimer + CH₂** (HRMS: C₃₉H₅₅N₂O₈: ber.679,3953; gef. 679,3967, C₃₉H₅₄N₂O₈Na: ber.701,3772; gef. 701,3785.
- Das H-3 der 4-O- Acyl- Tetramsäure kommt im ¹H immer bei ca. 6 und **fehlt hier**, zusätzlich ist C-3 im JMOD quartär.
- **Das C-3 ist mit 119 ppm sehr stark tieffeld-verschoben (normal bei 3-Acyltetramsäure ca.100)**
- Die drei anderen Quartären sehr stark hochfeld-verschoben 157, 170, 171 (normal bei 3-Acyl-TAM ca. 170, 190, 200)
- **Das H-5 der Tetramsäure ist stark tieffeld-verschoben (4,4 statt 3,6ppm)**
- **Das α-H des Decalins ist stark hochfeld-verschoben (2,8 statt 3,7ppm)**
- **zusätzliches Signal im ¹H (δ= 3,11 ppm, s), welches laut HSQC zu einer CH₂- Gruppe (δ= 16,5; 29,9 ppm) gehört, aber genau auf 1 integrieren (spricht für CH₂- Brücke im Dimer)**
- Das UV- Spektrum zeigt ein Absorptionsmaximum bei ca. 220nm, aber ohne erkennbare Schulter bei 254nm (wie bei 4-O-Acyl- TAM) und **ohne Maximum bei 280nm** (wie bei 3-Acyl- TAM)
- **233** entsteht bei 88 °C in DCM (könnte die zusätzliche CH₂- Gruppe spendieren) mit jeweils 2 Äq: CaCl₂, DMAP, NEt₃
- **233** entsteht mit dem TIPS- geschützten Alkohol, weswegen sich auch am benachbarten CH nichts ändert
- Kann das Dimer so symmetrisch sein, dass nur ein Signalsatz im NMR entsteht?

Top Spectrum (232): ¹H NMR spectrum of compound 232. The x-axis is Chemical Shift (ppm) from 5.5 to 3.0. The y-axis is Normalized Intensity from 0 to 0.010. The spectrum shows several peaks with integrations: 1.16, 1.37, 1.06, 0.17, 0.90, 1.00, and 3.43. A chemical structure of compound 232 is shown above the spectrum. The structure is a complex molecule with a TIPSOS group, a hydroxyl group, and a cyclohexene ring. The spectrum is labeled with M01(d) and M02(dd) with coupling constants J(M02)=11.25 Hz and J(M02)=6.04 Hz.

Bottom Spectrum (234): ¹H NMR spectrum of compound 234. The x-axis is Chemical Shift (ppm) from 5.5 to 3.0. The y-axis is Normalized Intensity from 0 to 0.055. The spectrum shows several peaks with integrations: 3.69, 2.64, 2.20, 2.75, 0.91, 1.09, 0.82, 0.96, 3.37, and 2.79. A chemical structure of compound 234 is shown above the spectrum. The structure is a complex molecule with a hydroxyl group, a cyclohexene ring, and a TIPSOS group.

94

B) Vergleich: Erster und Zweiter Versuch: NMR

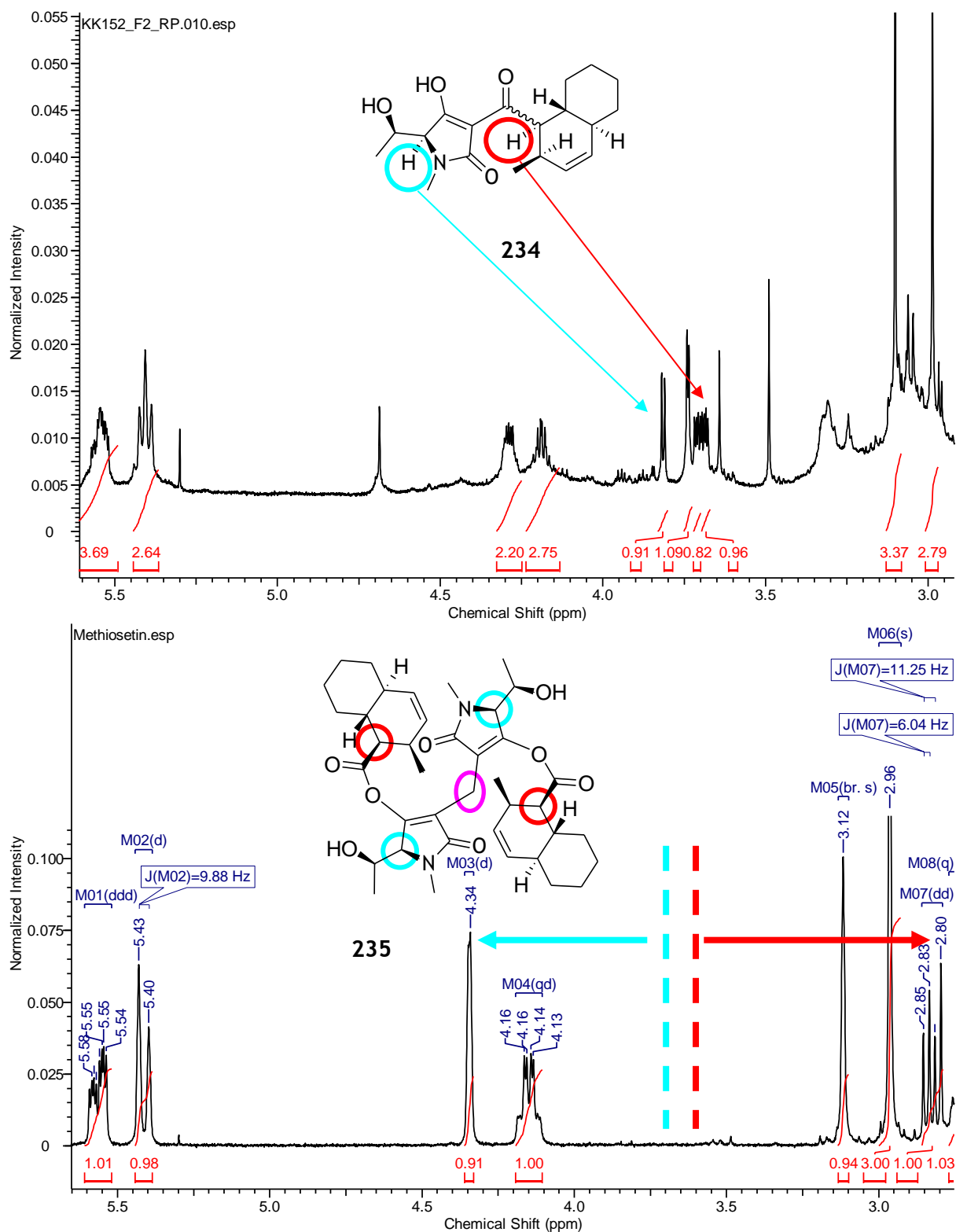


Abb. 99: Vergleich der ^1H - NMR- Spektren der entschützten Produkte des ersten (234) und zweiten (235) Versuches. Die größte Auffälligkeit bei 235: die **Tieffeldverschiebung des H-5 im Heterozyklus** und die **Hochfeldverschiebung des Ha im Decalin**. Zusätzlich beträgt die Kopplung zwischen beiden Threonin- H bei 234 wie im Naturstoff 4,5 Hz und bei 235 wie fürs Threonin üblich 2,4 Hz.

C) Zweiter Versuch unerwartetes Produkt 235:

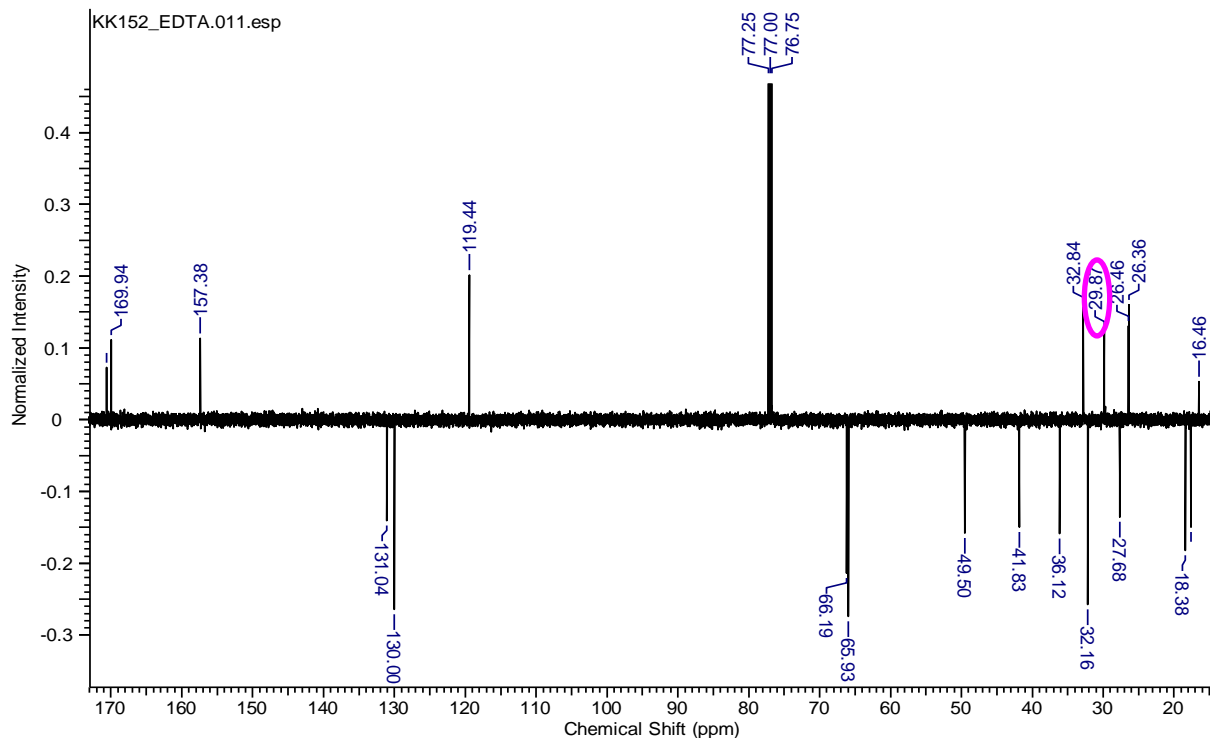


Abb. 100: ^{13}C - NMR- Spektrum von 235: ein quartäres Signal wie üblich bei 170, aber die anderen beiden sehr stark hochfeld-verschoben (normal bei 3-Acyltetramsäuren ca.190), C-3 quartär und sehr stark tieffeld-verschoben (normal ca.100), markiert das zusätzliche CH_2 - Signal der Dimer- Brücke

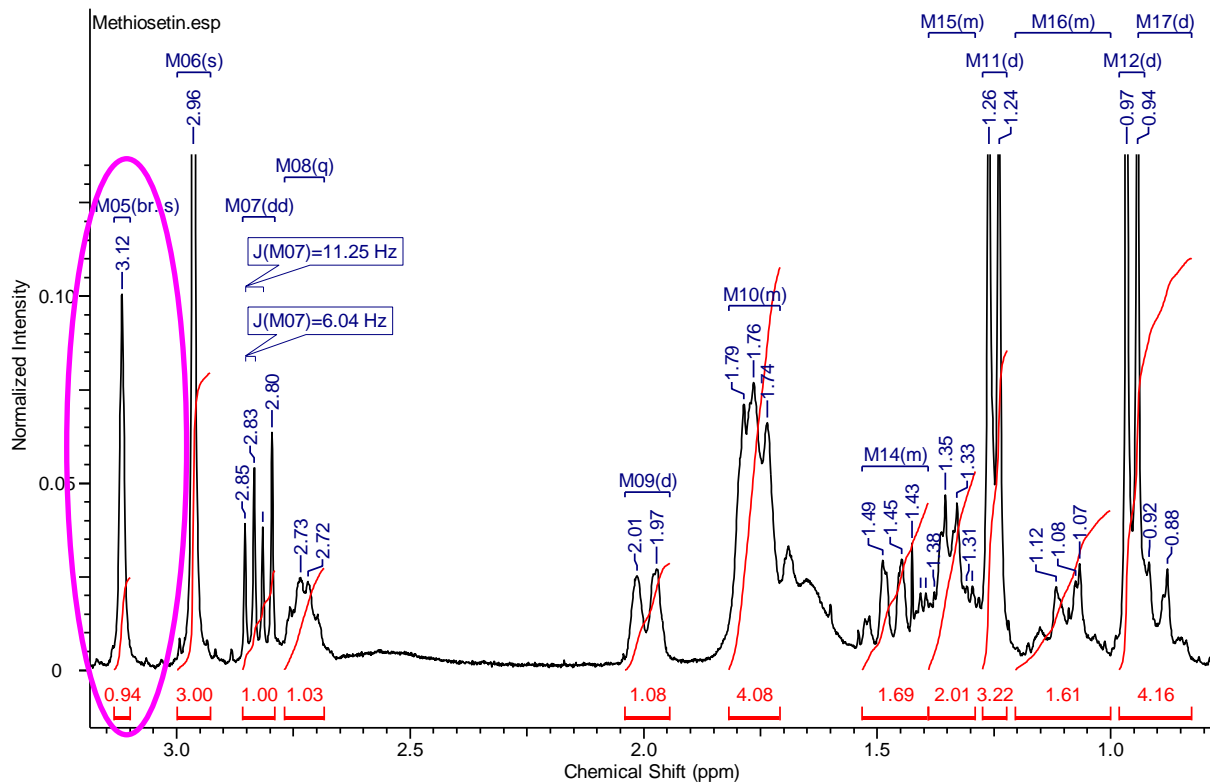


Abb. 101: ^1H - NMR- Spektrum von 235: es fallen die rosa markierten, ungewöhnlichen Signale auf, die zu CH_2 - Gruppen gehören, aber jeweils genau auf 1 integrieren

Oben gezeigte NMR-Daten zu **235** stammen von der **ersten HPLC- Fraktion (F1HP)**, die im NMR am saubersten und mengenmäßig die Hauptfraktion war.

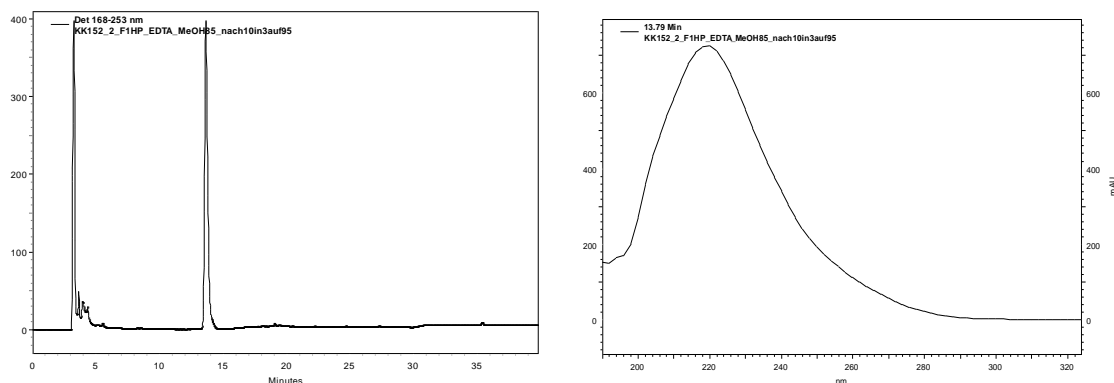


Abb. 102: Chromatogramm bei 263 nm auf der analytischen HPLC (Kinetex C-18) und UV-Absorptionsspektrum von **235 F1HP**; Das vordere Signal kommt wahrscheinlich durch das Waschen mit EDTA; im UV- Spektrum **fehlt die charakteristische Absorption für 3-Acyl- Tetramsäuren bei 280 nm** und die für 4-O-Acyl-Tetramsäuren charakteristische Schulter bei 254nm; es besteht lediglich ein Max. bei 220nm

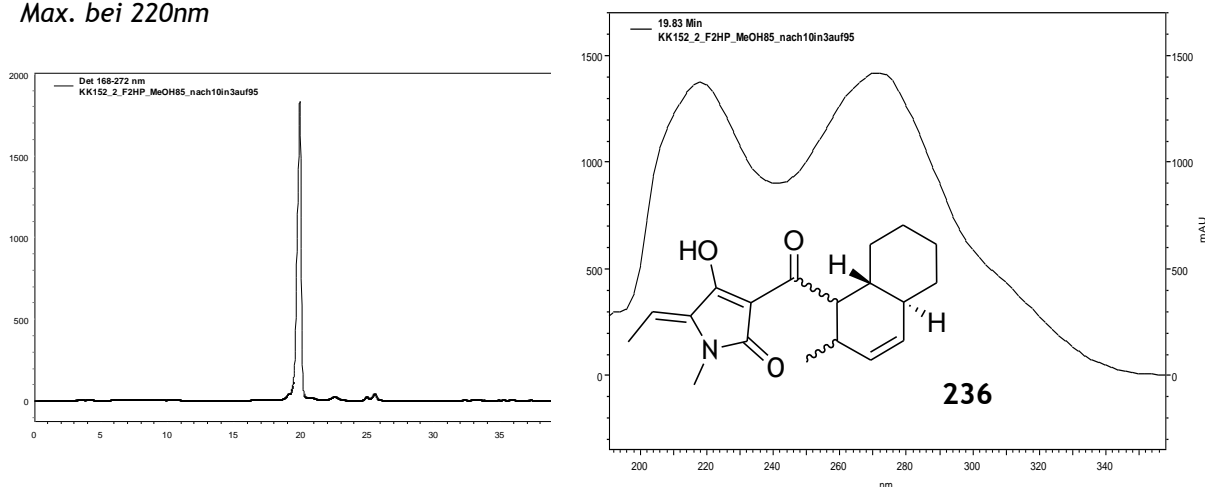


Abb. 103: Chromatogramm bei 272 nm auf der analytischen HPLC und UV- Absorptionsspektrum von **235 F2HP**: ist laut HPLC sauber und hat das charakteristische Maximum für 3-Acyl- Tetramsäuren bei 280 nm; im NMR aber überhaupt nicht sauber, sondern Mischung aus **235** und Eliminierungsprodukt **236**

Eine Idee zur Begründung der ungewöhnlichen NMR- und IR- Spektren war das potentielle Vorliegen von **234** als Calcium- Komplex. Der NMR- Vergleich mit Bernhards Melophlinkomplexen⁶⁷ zeigt, dass diese keine grundsätzlich andere Position der entsprechenden Signale aufweisen, als die unkomplexierten 3- Acyltetramsäuren. Als Beispiel dient das blau hervorgehobene C-3 der Tetramsäure, welches in der fraglichen Verbindung mit **119ppm** deutlich stärker tieffeldverschoben ist.

- Gallium: C^q wie üblich bei **98.9**, 174.5, 194.3, 195.6
- Lanthan: C^q wie üblich bei **101.0**, 173.2, 195.2, 196.0
- Chlorido(η⁶-p-cymene)(melophlinato C)ruthenium(II): C^q wie üblich bei 99.0, 99.8, **103.1**, 169.2, 172.5, 193.9, 194.1, 194.3, 194.4, 194.5, 195.1
- Magnesidin⁶⁸: C^q wie üblich bei **102.9**, 164.6, 182.4, 200.9

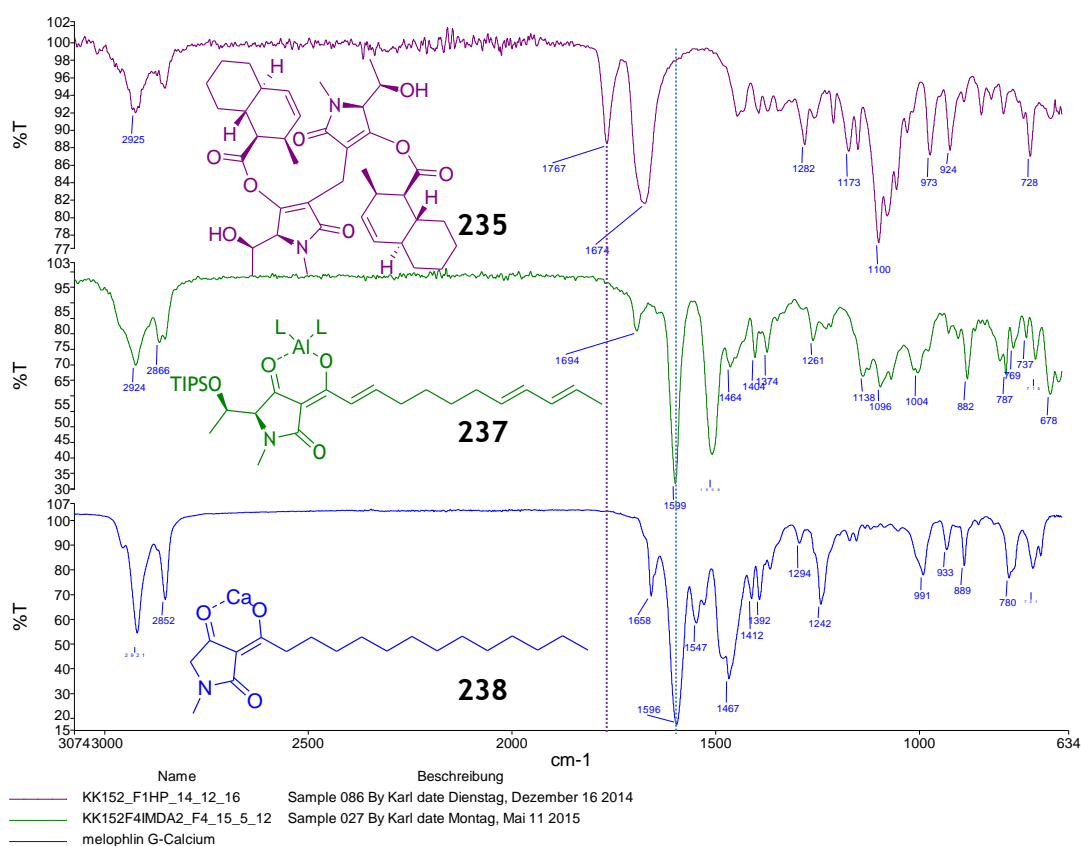


Abb. 104: Der IR- Spektren-Vergleich mit dem **Aluminiumkomplex 237** (in grün) und dem von Bernhard Biersack dargestelltem **Calciumkomplex 238** (in blau) zeigt deutliche Unterschiede in der Lage der Carbonylbanden, weshalb **235** nicht einfach nur der Calcium- Komplex sein kann.

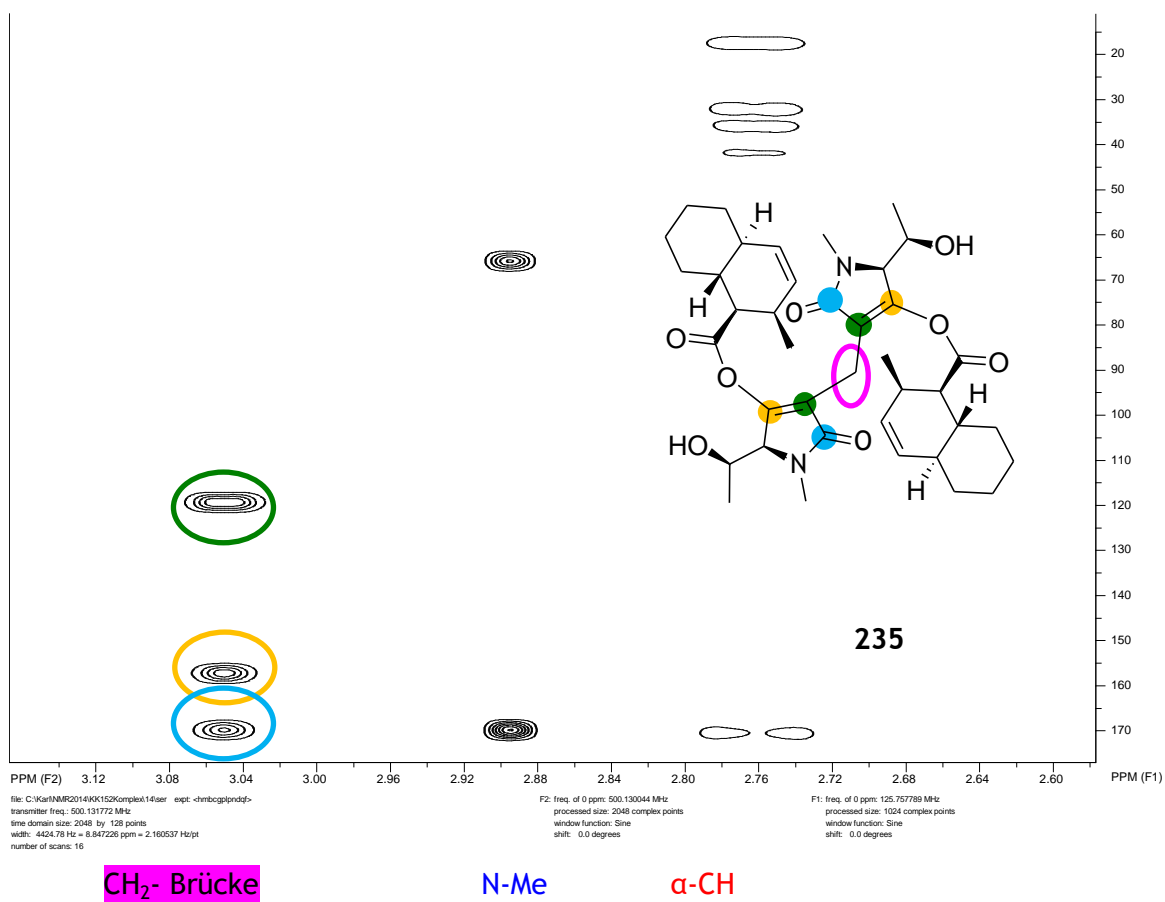


Abb. 105: HMBC- NMR von **235**: die farbig markierten Signale zeigen die Kopplung der Protonen der CH₂-Brücke mit den drei benachbarten quartären Kohlenstoffatomen.

D) Vergleich: Erster und Zweiter Versuch: IR

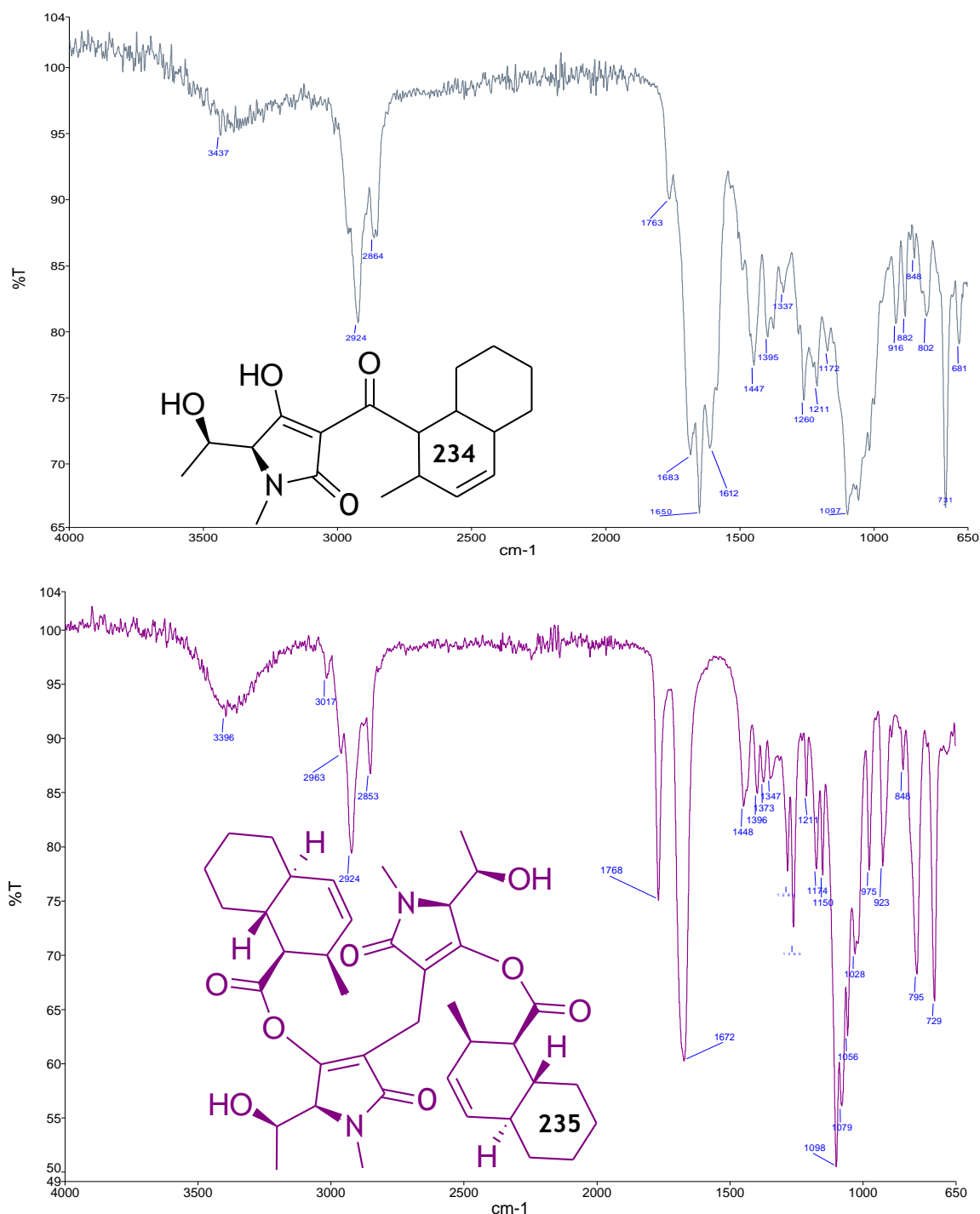


Abb. 106: Vergleich der IR- Spektren vom ersten Versuch (oben; mehrere Carbonylbanden zeigen die im NMR sichtbare Mischung aus Isomeren 234) und zweiten Versuch (unten): kein übliches Spektrum für 3-Acyl-Tetramsäuren (vgl. Abb. 107); hier nur zwei Carbonylbanden, das heißt, es fehlt das konjugierte nahezu planare Triacylsystem, entweder, weil (Spektrum ähnlich dem Aluminiumkomplex) die Delokalisierung durch Metallkoordination eingeschränkt ist, oder das Signal bei 1768 stammt von einem „einzelnen“ Carbonylkohlenstoff, welcher bei dieser Verbindung aus irgendeinem Grund nicht konjugiert ist

E) Vergleich: **234** nach Umlagerung/ IMDA

Nachdem sich die dargestellte Umlagerung als so problematisch herausgestellt hatte, kam ich auf die Idee, wieder einmal Ylid **148** mit dem sowieso von Markus Winterer hergestellten Decadienal umzusetzen, wobei wir **237** (als Komplex siehe Abb. 104) erhielten und mit Me_2AlCl zu **232** zyklisierten (siehe Abschnitt 4.5). Vergleiche von **234** nach IMDA+Entschützung mit dem Produkt des dritten Umlagerungsversuches (nach Entschützung), zeigen unterschiedliche Isomere derselben Verbindung **234**.

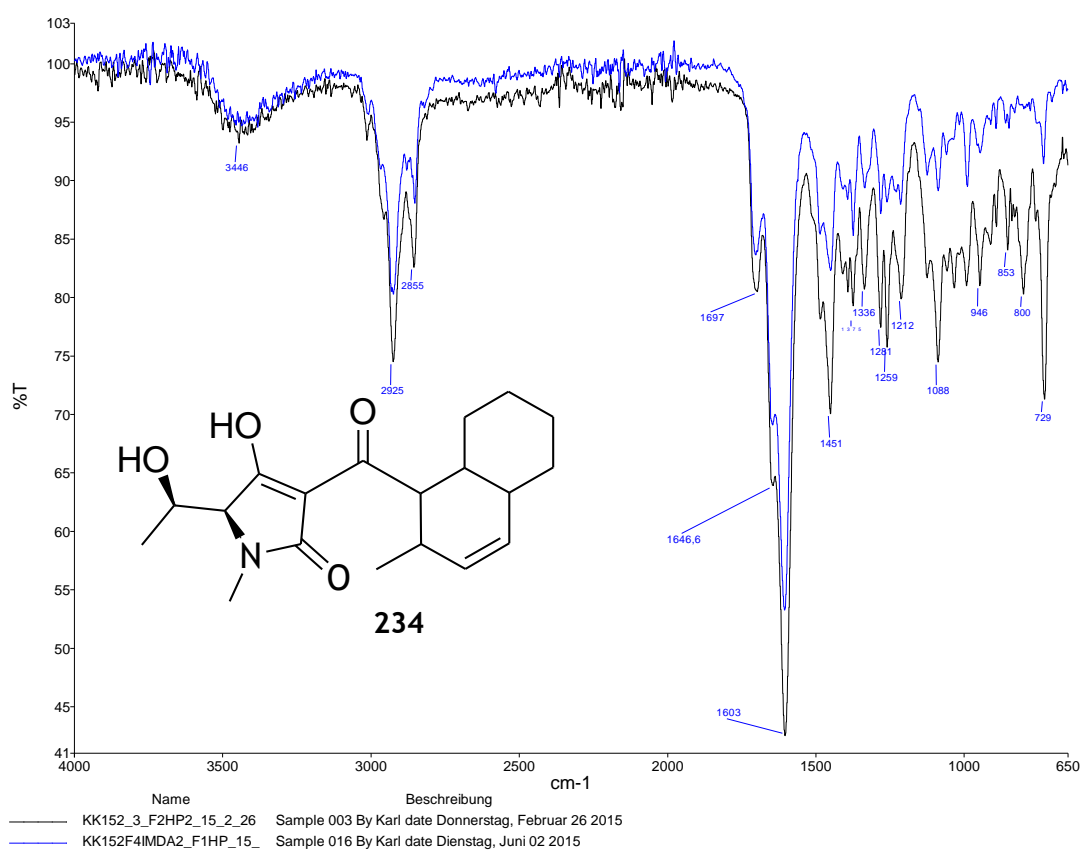


Abb. 107: Vergleich der IR- Spektren von Methiosetin **234** (blau: nach IMDA aus **237**, siehe 4.5, schwarz: nach Umlagerung aus **232**) entsprechen dem einer Standard 3-Acyl- Tetramsäure: charakteristisches Muster aus drei Carbonylbanden von 1700 bis 1600 cm^{-1} : klein-mittel-groß

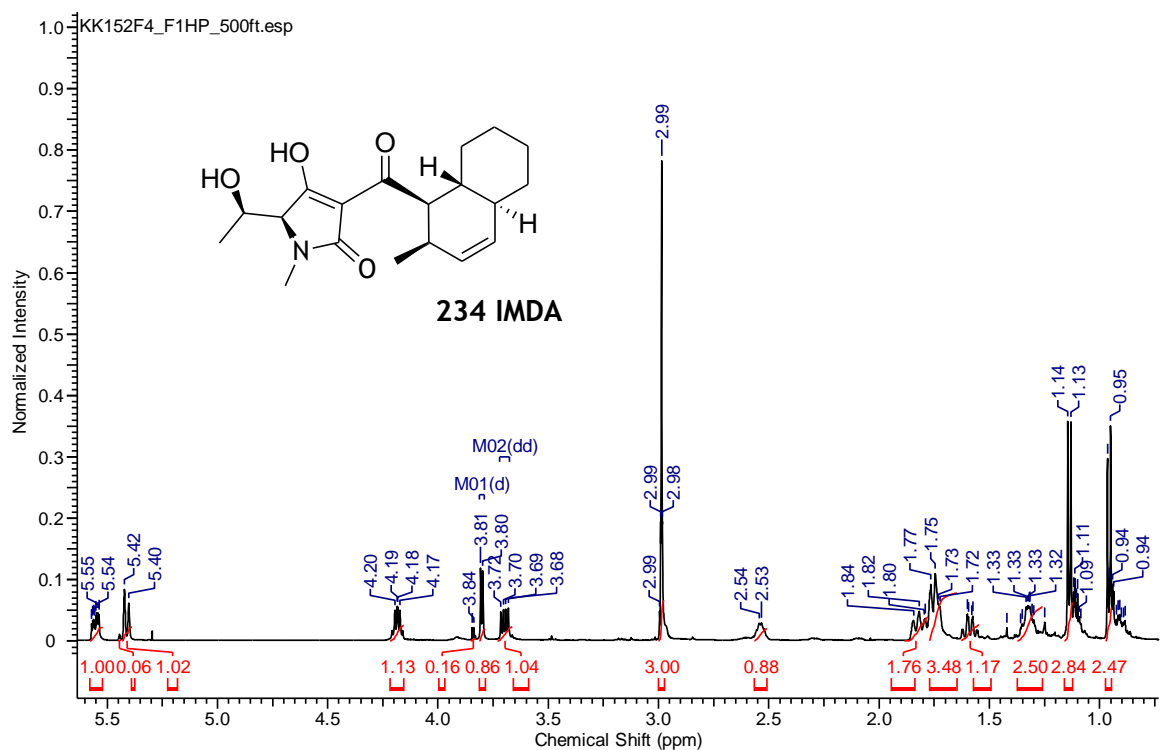
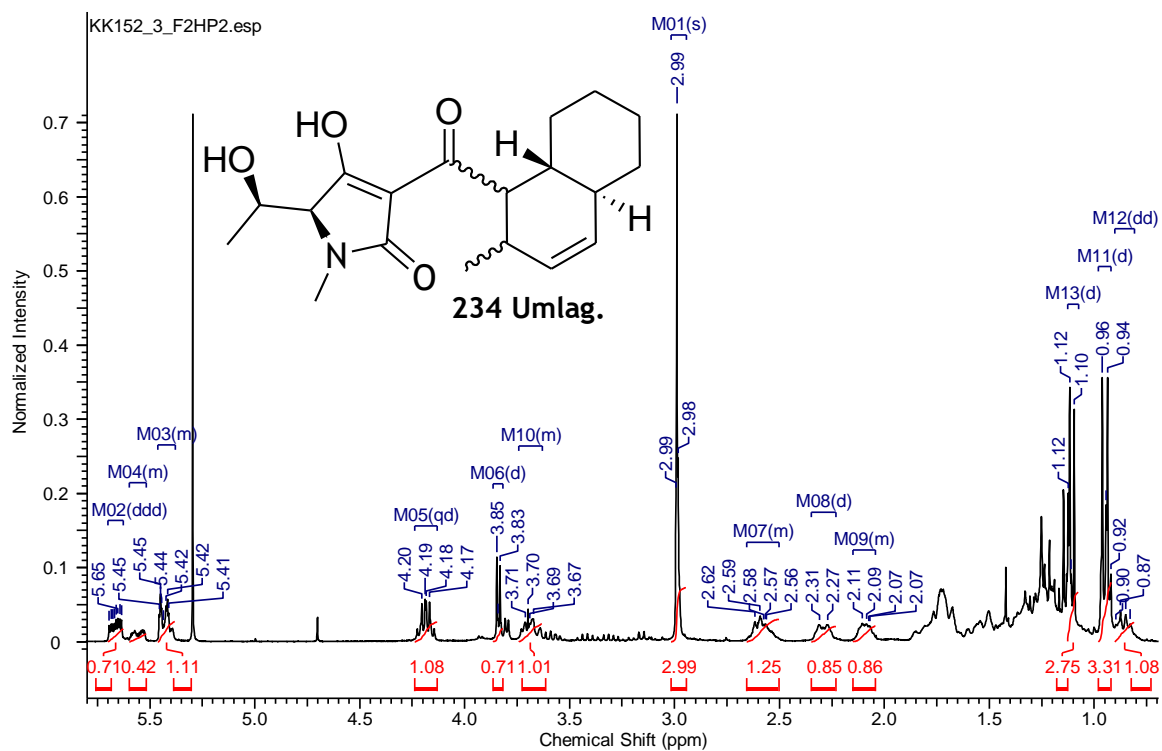


Abb. 108: Vergleich der ^1H -NMR- Spektren von Methiosetin **234** (oben: nach Umlagerung aus **232**, unten: nach IMDA aus **237**, siehe Abschnitt 4.5)

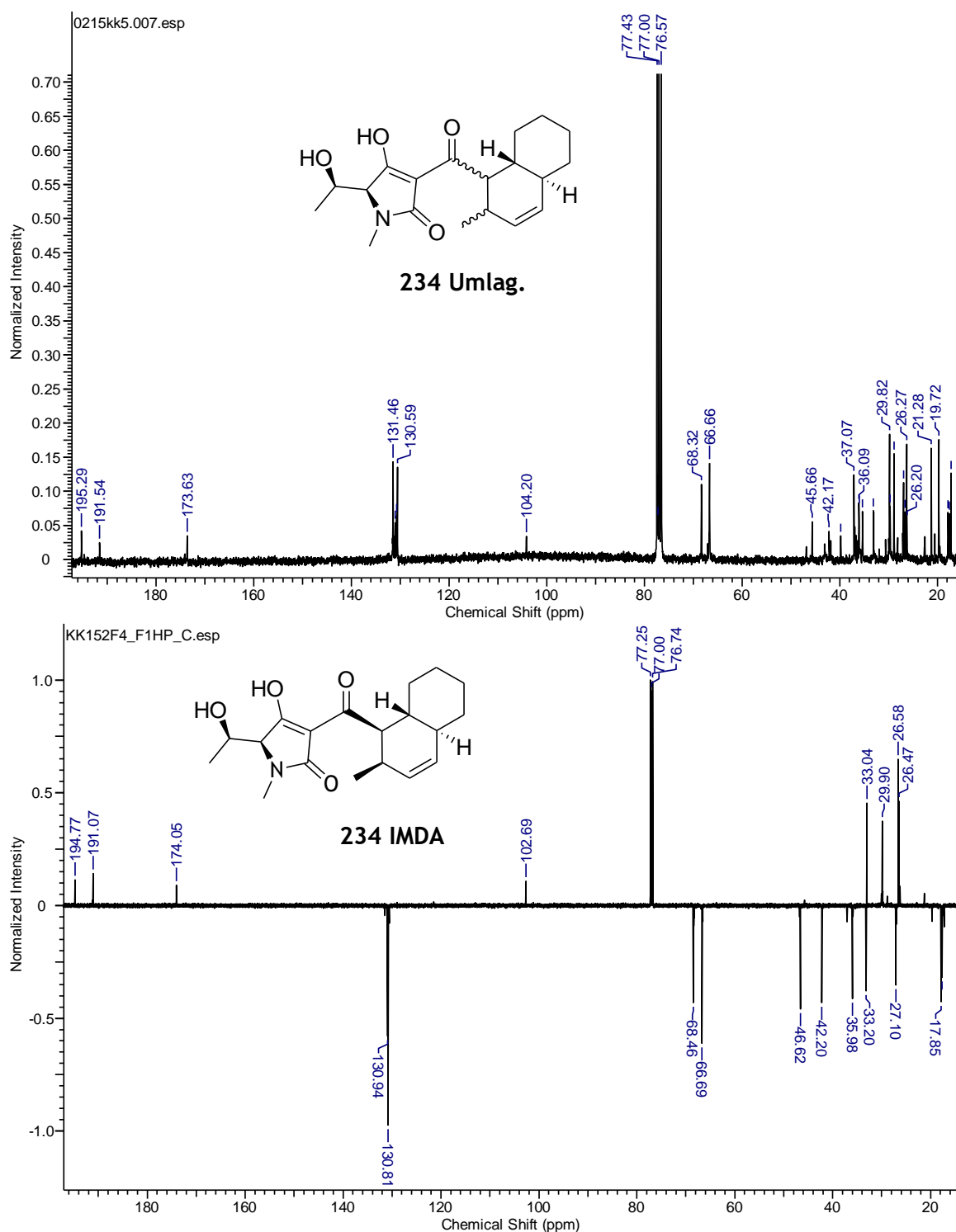


Abb. 109: Vergleich der ^{13}C -NMR- Spektren von Methiosetin **234** (oben: nach Umlagerung aus **232**, unten: nach IMDA aus **237**, siehe Abschnitt 4.5)

Zusammenfassend kann ich feststellen, dass die Acyumlagerung offenbar nur bei Diastereomerenmischungen (**Versuch 1 und 3**, siehe Tabelle 7) zum gewünschten 3-Acyl-Produkt führt. Dies kann man erklären durch die etwas geringere sterische Hinderung des Decalinsäure- Carbonyl- Kohlenstoffatoms bei Epimeren, bei denen die β - Methylgruppe *trans* zu letzterer steht. Dass diese besonders starke sterische Hinderung tatsächlich eine bedeutende Reaktivitätsänderung dieser Stoffklasse verursachen kann, zeigen folgende Beispiele:

1. Laut Herrn Professor Schobert konnten gewisse Decalinsäureester nicht verseift werden.
2. Markus Winterer fand heraus, dass das Hydroxydianion beim Evans- Derivat **239** eher das Oxazolidinon- Carbonyl- Kohlenstoffatom angreift (Abb. 109).

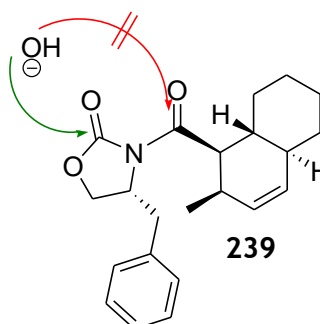


Abb. 109: unerwarteter regioselektiver Angriff von OH^-

3. Die 3-Acylierung unter Jones- Bedingungen mit Drimansäurechlorid **240**, letzteres charakterisiert durch zwei cis- ständige Methylgruppen in den β - Positionen, findet nur nach mehreren Epimerisierungen statt, wohingegen das sterisch weniger anspruchsvolle Säurechlorid **134** unter Retention der Stereoinformation (im Decalingerüst, nicht aber in der Tetramsäure) reagiert.

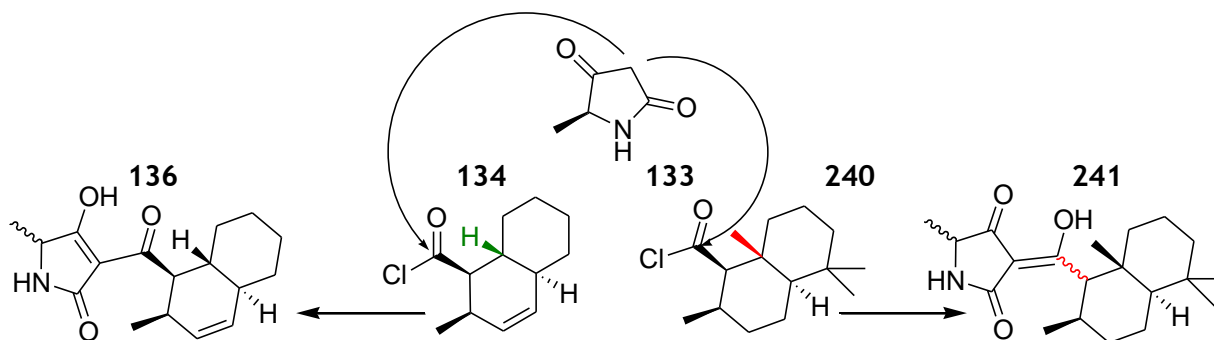


Abb. 110: Auswirkung der sterischen Hinderung bei der Acylierung von **133** mit Decalinoylchloriden **134** und **240**

4. Bei der oben beschriebenen Umlagerung im Falle reiner 2,3-cis- Decalinsäure (**Versuch 2 und 4**, siehe Tabelle 7) greift das C-3 von **231** offenbar eher das Lösungsmittel an.

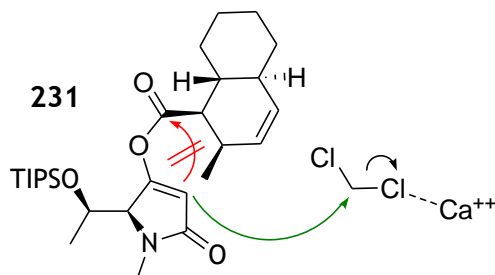


Abb. 111: postulierter Mechanismus des ersten Schrittes zur Bildung von **233** aus **231**

Nachdem also feststand, dass diese Umlagerung zwar unter Umständen ablaufen kann, aber die dazu nötigen harten Bedingungen Epimerisierungen und Nebenreaktionen begünstigen, andererseits die Zyklisierung von **237** ein unnatürliches Stereoisomer ergibt (Abschnitt 4.5), fiel mir wieder die selektive 3-Acylierung mit Keten-ylidentriphenylphosphoran **43** ein, welche unter sehr milden Bedingungen stattfindet. Daher hatte ich die Idee für folgende Retrosynthese für Methiosetin.

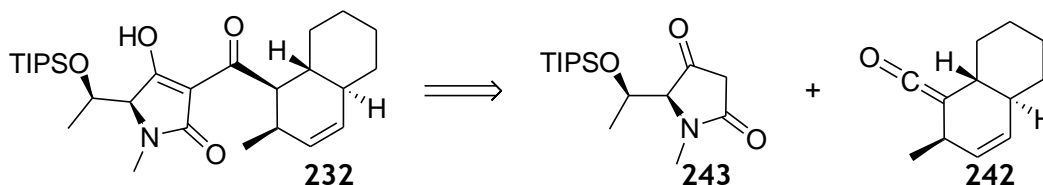


Abb. 112: Idee für selektive 3-Acylierung von Tetransäuren mittels Alkylketenen.

Da durch die Bildung des Ketenes **242** ein Stereozentrum verlorengeht, hängt die Konfiguration des Produktes von dem Mechanismus der Addition ab. Dabei spielt natürlich auch die Polarität des Lösungsmittels eine Rolle, ob das Keten von der Tetransäure **243** protoniert wird, oder eine konzertierte Addition erfolgt.

Einen interessanten Versuch habe ich zusammen mit Markus Winterer bereits durchgeführt:

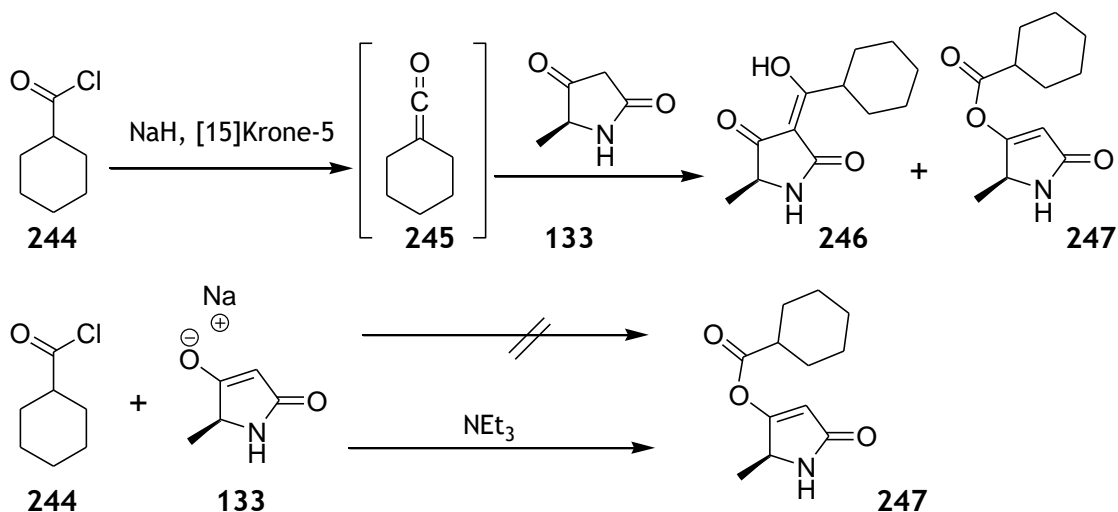


Abb. 113: Versuch zur selektiven 3-Acylierung von Tetramsäuren mittels Alkylketenen

Das kommerziell erhältliche Cyclohexansäurechlorid **244** wurde mit Natriumhydrid und Kronenether deprotoniert, wobei das Keten **245** auch über IR- Spektroskopie direkt nicht nachgewiesen werden konnte. Nach Zugabe von Tetramsäure **133** entstand laut UV-Spektrum in der analytischen HPLC eine Mischung aus **246** und **247**. Das Entstehen dieser Mischung lässt sich erklären durch eine partielle Bildung von **245**, welches dann mit **133** wie gewünscht zur 3- Acyl-Tetramsäure **246** reagiert. Noch nicht eliminiertes Säurechlorid reagiert wie üblich zur 4-O- Acyl-Verbindung **247**. Als Negativkontrolle wurde Säurechlorid, **133** und NaH zeitgleich zur Reaktion gebracht, wobei durch die geringe Löslichkeit des NaH in THF ohne Kronenether kein Produkt entstand; erst nach Zugabe von Triethylamin konnte wie erwartet **247** nachgewiesen werden.

4. Darstellung des Eigenanteils der Publikationen

4.0 Vorstellung der Schobert- Methode („Schlempf- Reaktion“)

Andrea Schlenk, Randi Diestel, Florenz Sasse and Rainer Schobert, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2599 - 2604

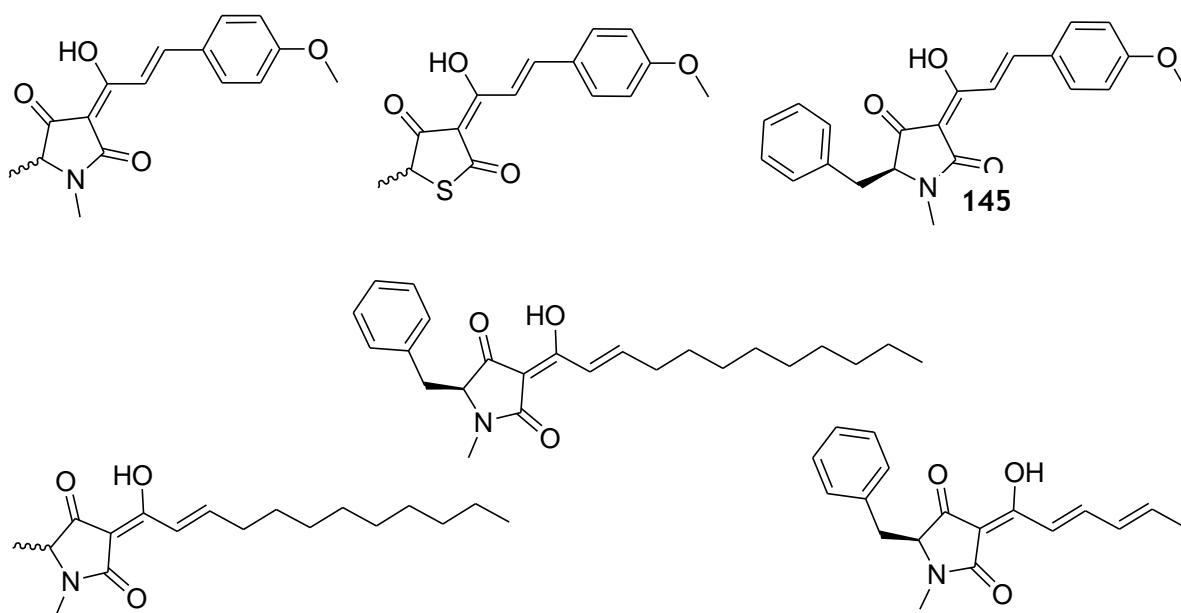
Diese Veröffentlichung wird als Punkt null gelistet, weil sie zwar nicht die erste Publikation mit meinem Namen ist; aber sie muss dennoch erwähnt werden, weil sie ohne mich nicht entstanden wäre.

Andrea Schlenk hatte bereits seit ihrer Zulassungsarbeit mehrere erfolglose Versuche zur Darstellung von Raveninsäure unternommen. Auch die Methode mit Meldrum's Säure (siehe Abschnitt 2.11), die die Stuttgarter Kollegen vorschlugen, schlug fehl. Erst, als ich die Reaktion des Tetramsäure- Acylylids mit Anisaldehyd bewiesen hatte und wir zusammen die Darstellung und Isolierung des Ylides etabliert hatten, konnte Andrea Schlenk die Raveninsäure erfolgreich synthetisieren. Aufgrund unserer Arbeit nannte Herr Schobert diese Wittig- Variante scherzhaft „Schlempf- Reaktion“.

4.1 Tetramsäurederivate für Biotests

Barnickel B., Bayliffe F., Diestel R., Kempf K., Laschat S., Pachali S., Sasse F., Schlenk A., Schobert R. **Structure-Activity Relationships of Precursors and Analogs of Natural 3-Enoyl-tetramic Acids.** *Chem. Biodiv.*, **7**, **2010**, 2830.

Hierfür habe ich die folgenden Verbindungen dargestellt:



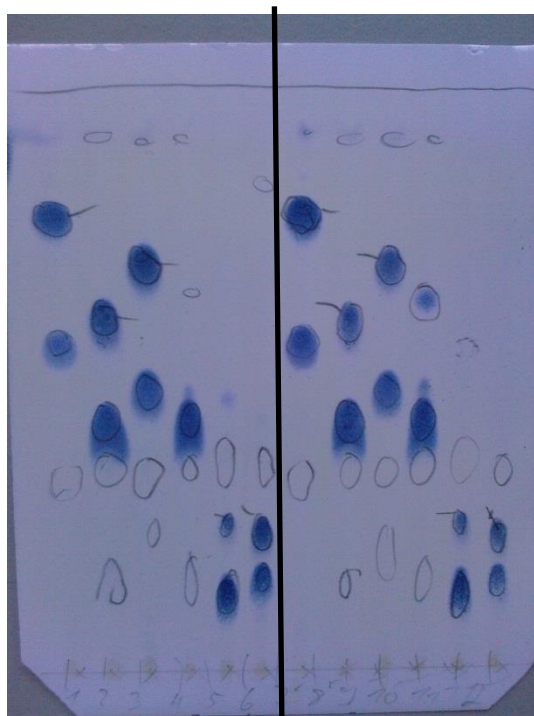
4.2 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Schutzgruppen für die β -Hydroxygruppe in Aminosäuren auf die Dominosynthese für Tetramate

Loke I., Park N., Kempf K., Jagusch C., Schobert R., Laschat S.

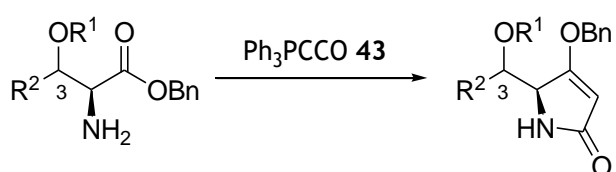
Influence of steric parameters on the synthesis of tetramates from α -amino- β -alkoxyesters and Ph_3PCCO

Tetrahedron, 68, 2012, 697.

Der nächste Schritt in der Optimierung der Dominosynthese zum Tetramat für die Penicillenole war die Untersuchung über den Einfluss der Schutzgruppen an der β -Hydroxygruppe. Es hatte sich bereits seit den Arbeiten von Sven Siegfried und Carsten Jagusch gezeigt, dass Aminoester aliphatischer Aminosäuren sehr gute Ausbeuten (~80%) liefern. Von den Anfängen mit Threonin- und Serinderivaten in unserer Arbeitsgruppe (meine Diplomarbeit 2008, zusammen mit Andrea Schlenk ab 2009) an fiel auf, dass hier nur eine durchschnittliche Ausbeute von gut 30% zu erreichen war. Da auch die Kollegen aus Stuttgart auf dem Weg zu Discodermid die Dominosynthese ausgehend von Hydroxyornithin nutzen wollten und ähnliche Erfahrungen machten, entstand die Idee, den Einfluss der Schutzgruppen an der β -Hydroxygruppe systematisch zu untersuchen. Die Ergebnisse der daraus entstandenen Veröffentlichung will ich hier nicht wiederholen, sondern meine Beiträge darstellen und noch einmal die Vorteile der 12 Parallelreaktionsgefäße zeigen. Als statistische Sicherheit wurden hier je zwei Gefäße mit gleichen Reaktanden beschickt. Zunächst wird das Ausrechnen und Abwiegen erleichtert; außerdem ist die Vergleichbarkeit der dünnschichtchromatographischen Analysen verbessert, wenn man direkt hintereinander alle Proben entnimmt und auf einer einzigen Platte auftrennt. Dadurch kann man zum Beispiel beim Vergleich der Bahnen 5/6 und 11/12, sowie 2/3 und 8/9 am Verhältnis Edukt zu Produkt schon deutlich erkennen, dass die Allothreoninderivate erheblich schlechter reagieren, als ihre Threoninanaloga.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



DC- Spuren	Kürzel	Konfiguration an C-3	R ¹	R ²
1, 7	alloTIPS	S	TIPS	Me
2, 8	threoTES	R	TES	Me
3, 9	alloTES	S	TES	Me
4, 10	norTES	--	TES	H
5, 11	ThreoMe	R	Me	Me
6, 12	alloMe	S	Me	Me

Weiterhin von mir für die Publikation synthetisiert wurden die **Benzyl- und die *tert*-Butyletherderivate von Serin, Threonin und Allothreonin**. Ebenfalls versuchte ich die obige Reaktion mit freier Hydroxygruppe unter verschiedenen der üblichen Standardbedingungen- leider erfolglos.

4.3 Synthese von Penicillenol C1 mit Zuordnung des α - Stereozentrums und Markierung mit Bisazid

Für diese Publikation habe ich alle Synthesen selbst geplant und durchgeführt; Aruna Raja hat nur die Fluoreszenzmarkierung beigesteuert.

Kempf K., Raja A., Sasse F., Schobert R. **Synthesis of Penicillenol C₁ and of a Bis-Azide Analogue for Photoaffinity Labeling**

Reprinted with permission from *J. Org. Chem.*, 2013, 78 (6), pp 2455-2461

DOI: 10.1021/jo3026737; Publication Date (Web): February 25, 2013
Copyright © 2013 American Chemical Society

4.4 Synthese von Penicillenol B1 und B2

Für diese Publikation habe ich alle Synthesen selbst geplant und durchgeführt; Florian Schmitt hat nur die sechs MTT- Tests und Frau Bilitewski die antibiotische Aktivität gemessen.

Kempf K., Schmitt F., Bilitewski U., Schobert R. **Synthesis, stereochemical assignment, and bioactivity of the *Penicillium* metabolites penicillenols B1 and B2**

Abruck mit Genehmigung von Elsevier Ltd. *Tetrahedron*, 71, 2015, 5064.

4.5 Synthese von Allo- Methiosetin und TA-289

4.5.1 Vorbemerkungen

Für diese Veröffentlichung hat Markus Winterer die Synthese der verwendeten Decalinsäure **248** entwickelt, deshalb habe ich deren experimentelle Daten nicht in meine Dissertation aufgenommen. Zusammen haben wir einige weitere Versuche zur Umlagerung der 4-O-Acyltetramsäuren unternommen. Markus hat bei der Suche nach einer sterisch gehinderten Test- Säure im Lager das Cyclohexansäurechlorid gefunden, aber dachte eher an dessen Hydrolyse. Da ich schon während meiner Diplomarbeit die Jones- Acylierung verwendet hatte, fiel mir diese wieder ein. Weiterhin stammt die Idee von mir, das von mir etablierte Ylid mit dem Decadienal aus Markus' Synthese umzusetzen und die Zyklisierung an der Tetramsäure durchzuführen. Die analytischen und präparativen HPLC- Läufe habe ich geplant und durchgeführt. Von Markus stammt die hervorragende Idee, durch einen Keto-Metallchelatkomplex (im Gegensatz zum Amid- Aluminium- Komplex) eine spiegelbildliche Induktion bei der IMDA zu erhalten. Der Gedanke war, dass durch die mit der Komplexbildung des Keto-Carbonylsauerstoffatoms einhergehende Drehung der Tetramsäure um 180° die große TIPS- Gruppe natürlich in die andere Richtung zeigt. Leider verhinderte die langsame Zyklisierung bei gleichzeitiger Silylentschützung ein positives Ergebnis, aber dennoch ist nicht ausgeschlossen, dass mit einer anderen Lewissäure oder Schutzgruppe der richtige Naturstoff entsteht. Von mir durchgeführt wurden die Analysen der chiralen HPLC, sowie das Sichten, Ordnen und Bewerten aller NMR und IR- Spektren. Ich habe die **zusätzlichen Signalsätze (von TA-289 über Jones- Acylierung 136Jones)** den Tautomeren (siehe Fig.2 im folgenden Manuscript) und Diastereomeren (siehe Fig.1 im folgenden Manuscript und folgende Abb.114) zugeordnet. Zunächst stach im eigentlich schönen ¹H- NMR von **136Jones** das **(im Gegensatz zu 136 hergestellt durch IMDA, blaue Kästen in Abb.114)** nicht gedoppelte Dublett der Octalin- Methylgruppe bei 0,95 ppm ins Auge **(grüner Kasten oben in Abb.114)**. Erst nach genauerer Analyse war mir das (mit geringerem Anteil) gedoppelte Signal für das α- CH im Octalin aufgefallen **(grüner Kasten unten in Abb.114)**.

Ich habe alle Ergebnisse zusammengefasst und schriftlich dargestellt. Diese Version wurde natürlich von Professor Schobert noch überarbeitet.

Komplett eingefügt in diese Arbeit habe ich das zuerst eingereichte Manuscript, da hier noch viel mehr wichtige Informationen enthalten waren.

4.5.2 Lösungsansätze für die Aufklärung der noch offenen Fragen

Drei der fünf Gutachter erkannten die Relevanz der dargestellten Ergebnisse und die Fülle an wichtigen Informationen für Chemiker, die auf diesem Gebiet forschen. Zwei Gutachter monierten die uns natürlich bekannten Probleme:

- Synthese von TA-289 nur als 1:1- Diastereomerenmischung nach Racemisierung der Tetramsäure
- Synthese von allo- Methiosetin ohne Beweis der erzeugten Stereochemie
- Methode liefert bisher nicht das natürliche Methiosetin

Natürlich existieren noch mehrere Möglichkeiten, wie man diese Probleme auch noch lösen könnte.

Lösungsansätze für Methiosetin:

- Der Aluminiumkomplex der zyklisierten 3-Octalinoyltetramsäure ist sehr stabil (lässt sich nur durch BF_3 dekomplexieren) und bietet dadurch ein gutes Potential zur Kristallisation. Die Röntgenstrukturaufklärung kann gleich zwei wichtige Aussagen liefern:
 - Absolute Konfiguration der Stereozentren
 - Komplexgeometrie/ Stöchiometrie
- Verwendung von anderen Gegenionen (z.B. Acetat oder Hexafluoroantimonat), welche die Löslichkeit der Lewissäuren in den apolaren Lösungsmitteln verbessern, welche wiederum die Diels-Alder- Cycloaddition begünstigen.
- Abspaltung der Octalinsäure (Vergleich mit über Evans- Auxiliar cyclisierte Säure durch NMR/Drehwert/VCD)

Lösungsansätze für TA-289:

- Schonendere direkt- 3- Acylierung des Tetramsäure $\text{B\ddot{A}t}_2$ - Komplexes
- IMDA mit chiralem Lewissäureliganden

Zusätzlich wollte Markus das Methiosetin zum Vergleich auch über Lacey- Dieckmann synthetisieren. Um die schon dargestellte Säure **248** zu verwenden, hatte er die Idee, **134** an Meldrum's Säure **39** zu acylieren (Abb. 115), um nach Erhitzen des Acylproduktes **249**

durch Abfangen des intermediären Ketenes mit Aminoester **250** direkt β - Ketoamid **251** zu erhalten. **251** kann quantitativ zum geschützten Methiosetin zyklisieren.

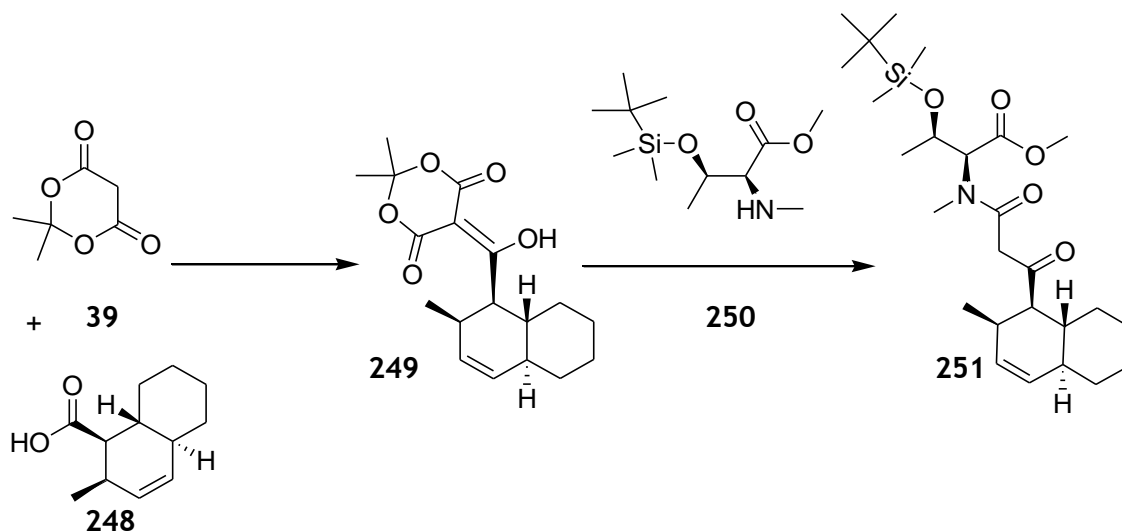


Abb. 115: geplante Synthese des β - Ketoamides **251** für die Synthese von Methiosetin nach Lacey-Dieckmann.

Daraufhin habe ich unter Zurückgreifen auf meine Erfahrungen mit N-Methylthreoninestern (3.3.1 Synthese der geschützten Tetransäure für Penicillenol C **12**) schnell noch eine kurze Route zu **250** etabliert (Abb. 116). Durch den kurzzeitigen Engpaß an TFA wurde **175** mit HCl erzeugt, was ein Grund für die schlechtere Ausbeute sein kann. Weiterhin wurde ohne Reaktionskontrolle erst nach 8h aufgearbeitet, wodurch im wässrig- sauren Milieu schon eine gewisse Menge an Ester **175** hydrolysiert sein könnte. Die Reduktion zu **176** mit großer Menge an TFA läuft, wie oben schon erwähnt, nicht ideal, aber der Verzicht auf das 30-minütige Rühren in wässriger HCl⁵⁷ verbesserte die Ausbeute. Da TBSCl relativ kostengünstig ist und auf intermediäre Schutzgruppen vollständig verzichtet werden kann, ist diese Route trotz der schlechten Ausbeuten und der benötigten großen Mengen teurer TFA eine praktikable Variante zur Synthese von Methylester **250**. Leider stellte sich heraus, dass **250** nach einigen Tagen Lagerung im Kühlschrank der Zersetzung anheimgefallen war. Interessanterweise hatte sich nicht, wie bei Aminoestern öfter zu beobachten, das (oligomere) Amid gebildet. Diese Umwandlung ist eindeutig schon im IR zu erkennen; **250** jedoch zeigte auch nach Zersetzung noch ein fast identisches IR- Spektrum inklusive Esterbande. Im NMR jedoch waren die Threoninsignale verschoben und die Silylsignale zu wenig, was auf Instabilität der TBDMS- Gruppe hinweist.

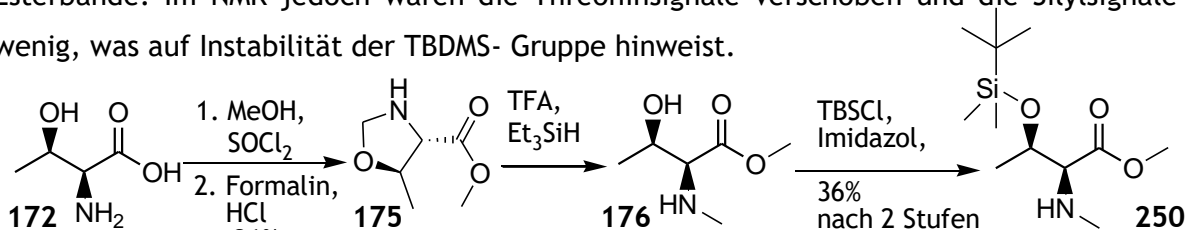


Abb. 116: kurze Synthese zum Threonin- methylester **250**.

Zunächst wurde **39** mit Albicansäure **251** als Testsystem unter Kondensation mittels EDC/ DMAP acyliert (Abb. 117).

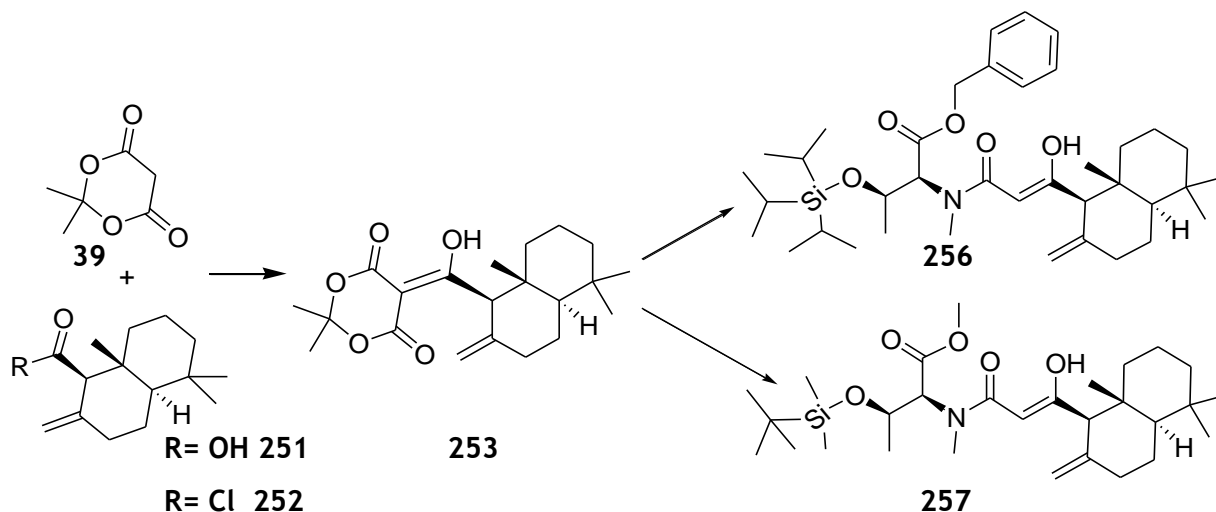


Abb. 117: Versuche zur Acylierung von **39** mit Albicansäure **251**

Das IR- Spektrum von **253** (Abb.118) zeigt ein typisches Triketosystem ähnlich einer 3-Acyltetramsäure. Die analogen Kondensationsprodukte von **39** mit einer Fmoc- (**254**) und einer Nosyl- geschützten Aminosäure **255** zeigen zwar nur je zwei Ketobanden, diese aber in einer ähnlichen Lage von $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$ und $\sim 1735 \text{ cm}^{-1}$. Da **250** zu diesem Zeitpunkt noch nicht fertig war, wurde der TIPS- geschützte Threoninbenzylester **205** für den Versuch zur Weiterreaktion verwendet. Dabei entstanden mehrere säulenchromatographisch trennbare Fraktionen, von denen aber keine zweifelsfrei als β - Ketoamid **256** identifiziert werden konnten. Die entsprechende CH_2 - Gruppe war weder im $^1\text{H-NMR}$ noch im $^{13}\text{C-NMR}$ zu erkennen. Natürlich erscheint es logisch, dass **256** hauptsächlich in der Enol- Form vorliegt, da es durch Addition an das (nach Zerfall der Meldrumssäure gebildete) Keten entsteht. Dennoch fehlte ebenso ein stark tieffeldverschobenes Kohlenstoffsignal für den Enol. Desweiteren bildete sich aus den fraglichen Produktfraktionen nach Umsetzen mit NaOMe in MeOH laut HPLC- Analyse auch keine 3-Acyltetramsäure. Das kann aber auch daran liegen, dass das Estercarbonylkohlenstoffatom in **256** selbst für die intramolekulare Dieckmann- Zyklisierung durch die Benzyl- und TIPS- Gruppen zu stark sterisch gehindert ist. Weiterhin hatte Markus Petermichl herausgefunden⁶⁹, dass die Enolform überhaupt nicht zyklisiert, sondern erst nach Rückisolierung und Tautomerisierung weiterreagierte.

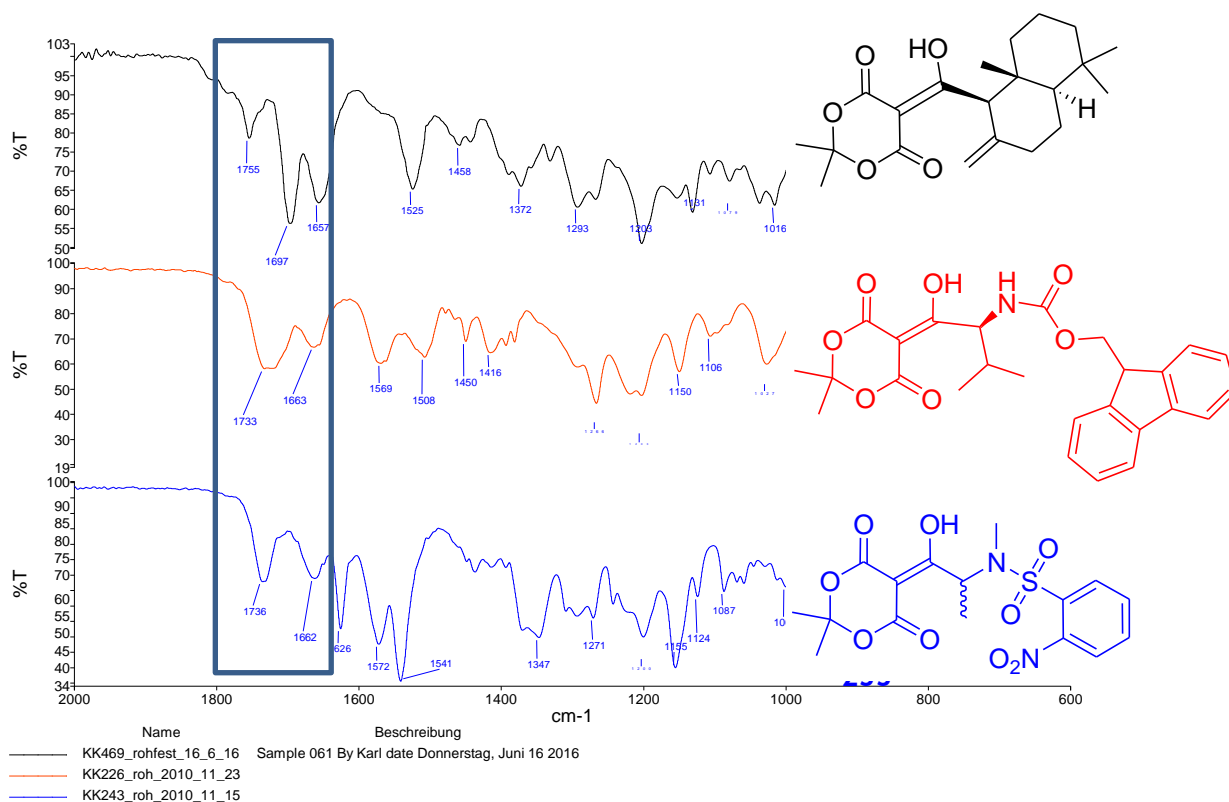
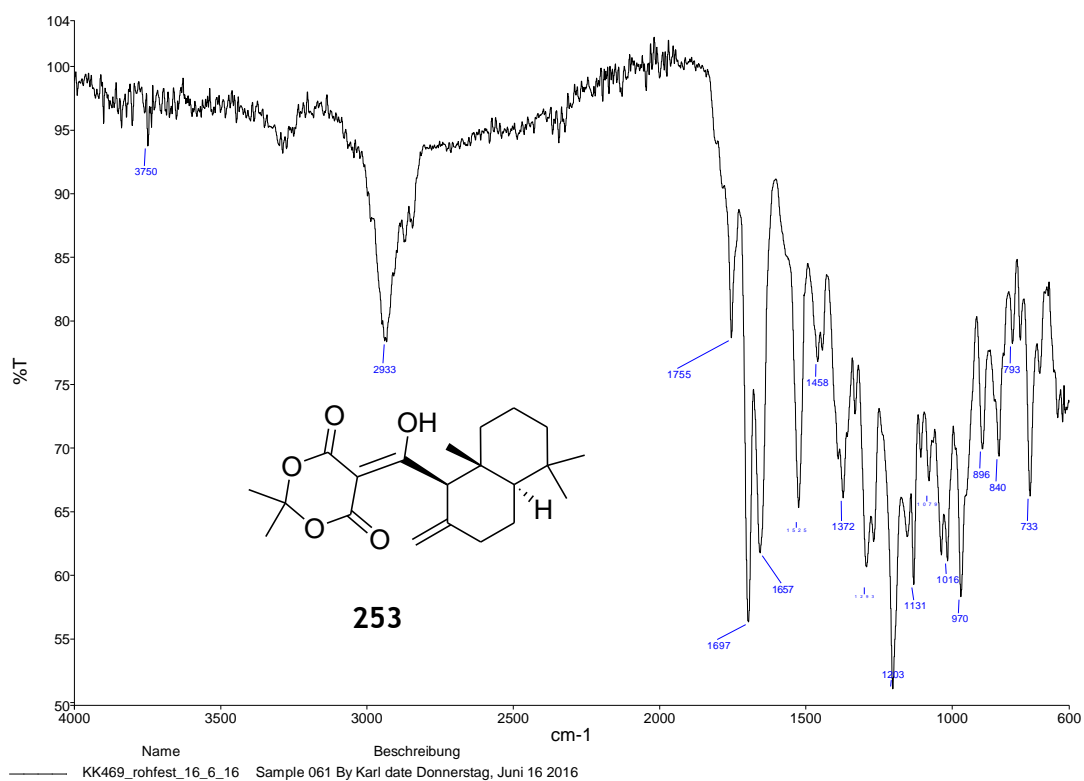


Abb. 118: IR- Spektrum von 253 und Vergleich mit analogen C- Acyl- Meldrumssäurederivaten

Also versuchten wir zunächst **253** zweifelsfrei zu identifizieren und die Acylierung zu optimieren. Da Matthias Göhl das Säurechlorid als beste Aktivierung der Decalinsäuren empfohlen hatte, setzten wir also **252** mit zwei äquivalenten Pyridin und **39** in DCM um. Bei Raumtemperatur waren allerdings auch nach Rühren über Nacht die typischen IR-Schwingungen von **39** bei 1789 cm^{-1} und 1748 cm^{-1} , sowie von **251** bei 1798 cm^{-1} noch deutlich und alleinig zu erkennen. Erst nach einer weiteren Nacht Kochen bei 40°C hatte sich das Bandenmuster geändert. Die weitere Umsetzung des evaporierten Rohproduktes mit **253** lieferte leider laut DC wieder keine eindeutige Produktfraktion. Dennoch konnte **257** eindeutig massenpektrometrisch nachgewiesen werden ($\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{NO}_5\text{Si}^+$: berechnet 522,3609; gefunden 522,3604). Eine Verbesserung der Ausbeute sollte erreicht werden, wenn man **253** wieder auf die schonendere Weise über DCC/DMAP herstellt und anschließend die Bedingungen zur Reaktion mit **250** optimiert, so dass die thermische Belastung für den, wie sich erst später herausgestellt hatte, labilen Aminoester **250** so gering wie möglich gehalten wird.

Noch schonender ist natürlich die Silber- katalysierte Aminolyse⁴⁷ des β -Keto- Thioesters **258**. Zum Zeitpunkt unserer Synthese im Sommer 2016 war das dafür benötigte⁷⁰ *tert*Butylthioacetat **259** leider nicht kommerziell erhältlich und die Synthese von **259** in Toluol durch einen Laborkollegen hatte ebenfalls nicht funktioniert; erst später konnte **259** durch Verwendung von Benzol dargestellt werden.

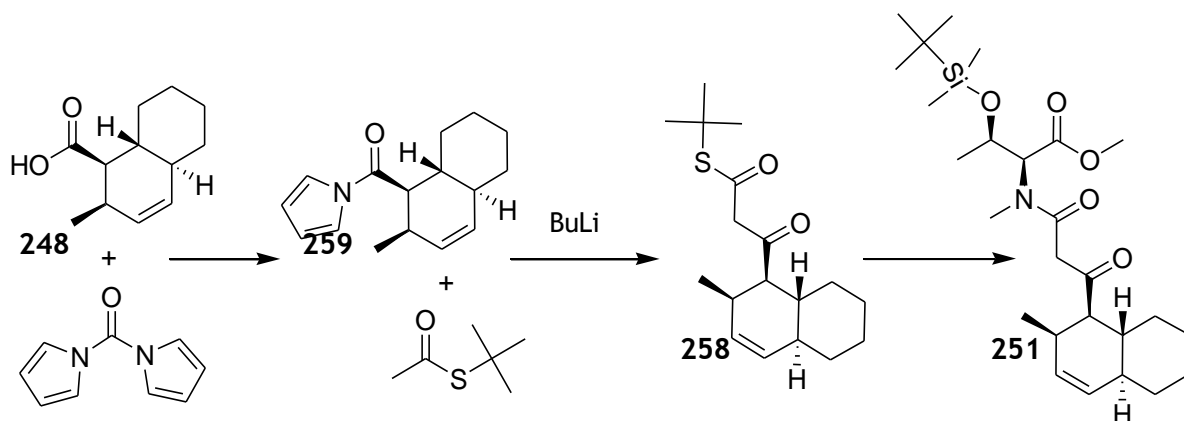


Abb. 119: Alternative Synthese des zur Darstellung von Methiosetin benötigten β -Keto-Amides **251** von der Carbonsäure **248** über den β -Keto- Thioester **258**.

Analog kann man dann das Methiosetinisomer mit dem positiv drehenden Enantiomer von **248** synthetisieren und nach Vergleich mit dem Drehwert des Naturstoffes dessen Struktur aufklären.

Zur weiteren Untersuchung der IMDA habe ich zunächst aus dem schon verwendeten Vorläufer **202** mittels der bereits erarbeiteten Optimierungen die TBDPS- geschützte 3-Acyltetramsäure **262** hergestellt (Abb.120). Dabei war erfreulich, dass die Schlempf-

Reaktion von **261** zu **262** nach zwei Stufen 61% Ausbeute lieferte. Das Nadelöhr war aber wie immer die Zyklisierung von **260** zum Tetramat, die durch die extreme sterische Hinderung nur mit 12% ablief. Nach der üblichen Rückisolierung einer beträchtlichen Menge **260** und erneuter Umsetzung erhielt ich immerhin genug Material für die folgenden Synthesen und nach drei weiteren Stufen für einen präparativen Versuch von 0,12 mmol **260**.

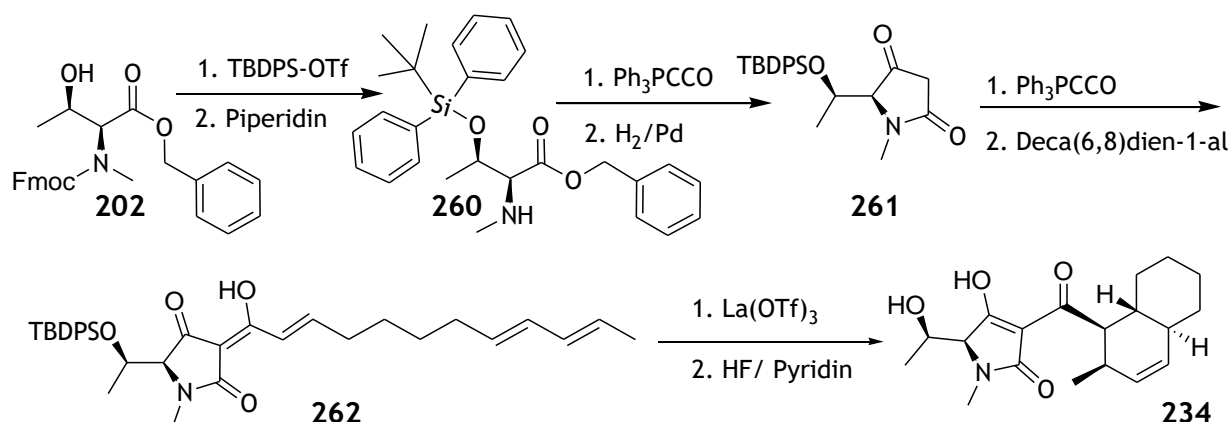


Abb. 120: Synthese der TBDPS- geschützten 3-Acyltetramsäure **260** zur Darstellung von Allo-Methiosetin **234**

Leider war zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar, dass die IMDA mit $\text{La}(\text{OTf})_3$ das gleiche unnatürliche Diastereomer von **234** entstehen ließ, wie mit Aluminium. Bekannt war nur, dass $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ zwar den gewünschten Ketokomplex bildet, aber auch unter Zugabe von verschiedenen polaren Lösungsmitteln kaum in Lösung ging. Deshalb wurde diese Testreaktion mit dem in DCM sehr gut löslichen $\text{La}(\text{OTf})_3$ durchgeführt. Im ^{13}C - NMR- Vergleich des entschützten **234** erkennt man dann nicht verwunderlicherweise das gleiche Diastereomer (siehe Abbildung 121), wie aus der Zyklisierung des TIPS- geschützten Derivates.

Dennoch kann man folgende Informationen aus diesem Versuch festhalten: Die starke sterische Hinderung führt auch bei guten Lösungseigenschaften der Lewissäure zu deutlich langsamerer Zyklisierung im Vergleich zur TIPS- Gruppe (5 versus 2 Tage). Der Hauptgrund für die Verwendung der TBDPS- Gruppe war deren höhere Stabilität im Hinblick auf die beobachtete TIPS- Entschützung bei Lanthannitrat und Kupfertriflat. Tatsächlich war mit Lanthantriflat, im Gegensatz zu der beobachteten partiellen TIPS- Entschützung bereits nach 2 Tagen, die TBDPS- Gruppe auch nach 5 Tagen stabil. Andererseits reicht eben die Stabilität der TIPS- Gruppe beim milderen Kupferacetat auch bei langer Reaktionszeit aus, um eine Entschützung vollständig zu verhindern.

Für den übersichtlichen Vergleich von den synthetischen Proben zum Naturstoff habe ich eine neuartige Auftragung entwickelt, bei der die Differenz der von gemessenen NMR-Kohlenstoffsignalen zu den veröffentlichten Werten des Naturstoffes an jedem Kohlenstoffatom gezeigt wird. Der Vergleich der drei Produkte legt nahe, dass geringe Abweichungen von Ungenauigkeiten in der NMR- Messung herrühren, aber dennoch signifikante Abweichungen vom Naturstoff vor allem in der Nähe der entscheidenden Stereozentren auftreten (C1,2,11; C4',5',7'). Die Abweichungen zeigen aber untereinander immer in dieselbe Richtung und weisen gleichzeitig **parallel** an einzelnen Kohlenstoffatomen jeweils **kleine oder größere** Abweichungen auf.

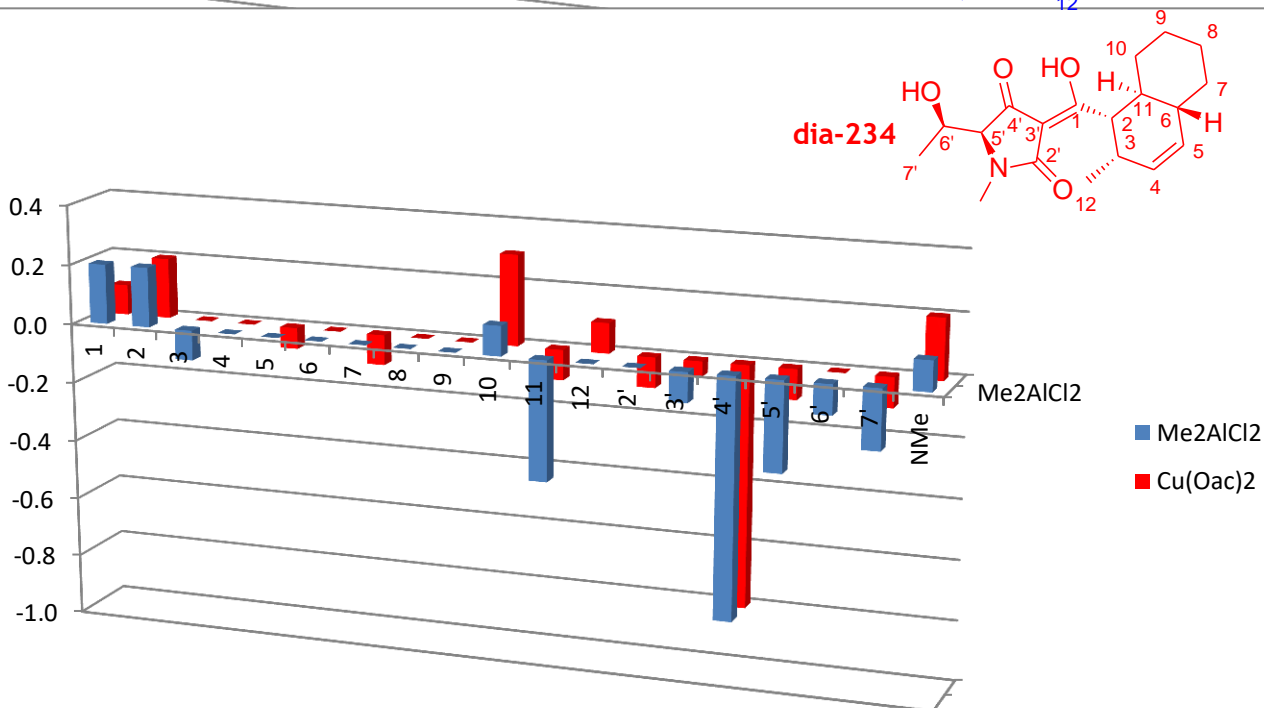
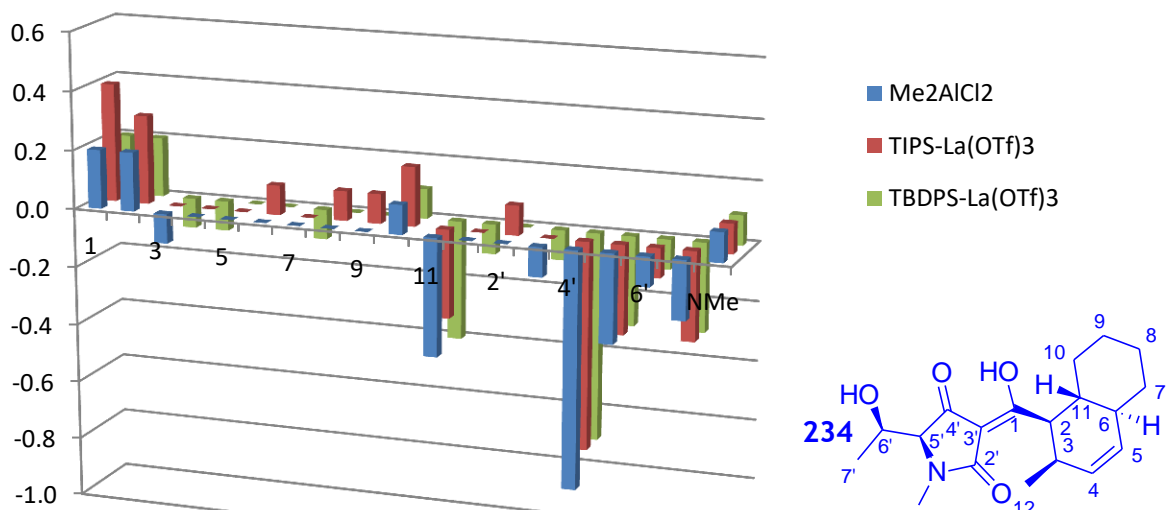


Abb. 121: Differenz der gemessenen ^{13}C -NMR- Signale der Produkte **234** (nach Zyklisierung mit den angegebenen Lewis- Säuren, Struktur von **dia-234** nur postuliert) zu den veröffentlichten Werten des **Naturstoffes** in Abhängigkeit der jeweiligen Kohlenstoffatome a) die drei gleichen Diastereomere weisen parallele Abweichungen vom Naturstoff auf; b) die unterschiedlichen Diastereomere (beide vorher TIPS- geschützt) zeigen an spezifischen Kohlenstoffatomen reziproke Abweichungen.

Ganz anders beim durch chirale HPLC (siehe Abb.122) nachweislich anderen Diastereomer aus der Zyklisierung mit Kupferacetat (siehe folgender Abschnitt). Hier sehen wir zwar ebenfalls zu hohe Abweichungen, besonders an den entscheidenden Positionen 1, 2, 10, 11, 12 und NMe, um ohne weiteren Vergleich die Präsenz des Naturstoffes postulieren zu können. Ebenso klare Reziproke (damit meine ich keine bzw. kleine versus große Abweichung) Unterschiede werden deutlich an den Kohlenstoffatomen im Oktalin 1, 3, 5, 7, 10, 11, 12 sowie im nahezu gesamten Tetramsäureteil.

Eine Übersicht über alle von uns getesteten Lewis- Säuren zeigt folgende Tabelle.

Tabelle 8: Die Auswirkung der zur Katalyse der IMDA getesteten Lewis- Säuren auf die Reaktionsgeschwindigkeit, die Stabilität der TIPS- Gruppe und die Komplexorientierung

Lewis- Säure	Reaktionsgeschwindigkeit	TIPS-Entschützung	Komplexorientierung
AlMe ₂ Cl	schnell (über Nacht)	-	Amid
TiCl ₄	schnell	-	Amid
Cu(OTf) ₂	langsam (7 Tage)	+	Keton
Cu(OAc) ₂	extrem langsam (3 Monate)	-	Keton
La(NO ₃) ₃	Langsam	+	Keton
La(OTf) ₃	schnell	+	Mischung
MgBr ₂ +MgCl ₂	langsam	-	Keton
CaCl ₂	sehr langsam (Wochen)	-	Keton
ZnCl ₂	schnell	-	Mischung
BF ₃ ×OEt ₂	schnell (Zersetzung)	+	Amid
BBr ₃	Zersetzung	+	Amid

Als letzter Versuch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Kupfer noch die neben Lanthan zweite vielversprechende Lewissäure getestet, welche den gewünschten Keto-komplex bildet. Um die beobachtete Entschützung zu verhindern, wurde Kupferacetat eingesetzt. Um die Komplexbildung mit dem schlecht organik- löslichen Kupfersalz zu erleichtern, wurde dieses zunächst in Methanol mit der Tetramsäure bis zur vollständigen Lösung innerhalb von 15 Minuten gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels i.Vak. zeigte der entstandene **grüne Kupferkomplex** im IR- Spektrum wie erwünscht nur zwei Carbonylbanden deutlich unterhalb von 1700 cm⁻¹ und ließ sich außerdem leicht in Chloroform lösen. Wie zu erwarten war, verlief die Zyklisierung mit dem unreaktiveren Acetat extrem langsam. Nach einer Woche war nur ein kleiner Teil bereits zyklisiert. Auch nach 14 Wochen war die Umsetzung weit fortgeschritten, aber keineswegs vollständig. Tatsächlich ist die TIPS- Schutzgruppe unter diesen Bedingungen absolut stabil, denn entschütztes Produkt war auf der HPLC nicht sichtbar. Weiterhin bemerkenswert ist die

Stabilität des Kupferkomplexes, aus welchem sich für analytische Proben durch Extraktion mit 0.5M Na₂EDTA- Lösung die Tetramsäure nur partiell freisetzen ließ. Präparativ blieb nach derselben mehrmaligen Extraktion der Komplex erhalten, lief in breiter Form über die HPLC und war nach Einrotieren des Methanols in der Wasserphase (mit 0.1% Ameisensäure) löslich. Erst nach einer Stunde Stehenlassen in dieser sauren Lösung war der Komplex hydrolysiert und die Tetramsäure konnte nach erneuter Extraktion mit EDTA vom Kupfer befreit werden. Nach einem zweiten Durchgang präparativer HPLC erhielt ich eine kleine Mischfraktion aus mehreren Diastereomeren und eine große Reinfraction **234**.

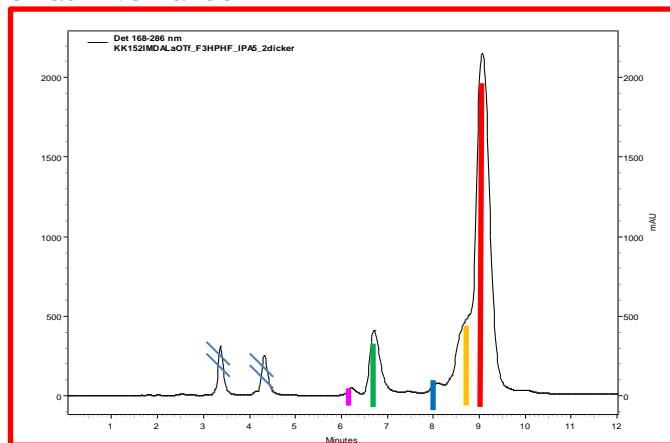
Die analytische chirale HPLC (Phenomenex Lux 5 μ m Amylose-1, 150*4.6 mm, nHexan +0.1%HCOOH/ Isopropanol +0.3%AcOH, isokratisch 95/5; siehe Abb. 122) zeigt beim Vergleich der Zyklisierungsprodukte **234** von unterschiedlichen Lewissäuren insgesamt fünf verschiedene trennbare Diastereomere mit folgenden Retentionszeiten:

6,1 min -- 6,7 min ---- 8,0 min -- 8,6 min - 9,0 min

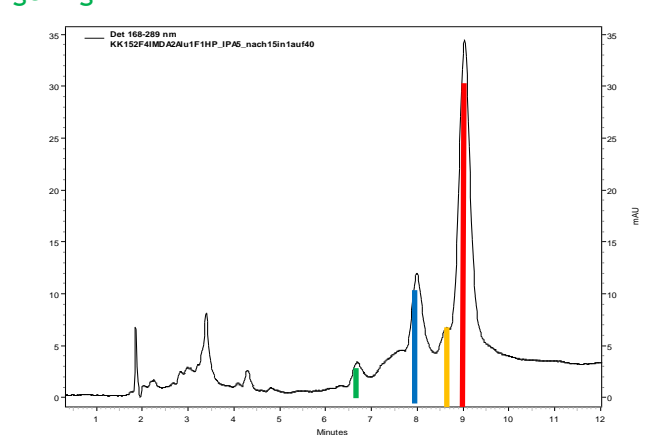
Bei fast allen Lewissäuren ist das polarste (bei 9min) das **Hauptisomer**. Da die Reaktionen mit hoher Selektivität auch mit vergleichsweise hoher Geschwindigkeit (über Nacht) abliefen, liegt es nahe, dass es sich hierbei um das **kinetische Diastereomer** handelt. Dies erklärt auch die schlechtere Selektivität mit der größeren TBDPS- Schutzgruppe, die ja eigentlich eine bessere Stereoinduktion bewirken sollte. Aufgrund der sterischen Hinderung und der damit verbundenen deutlich langsameren Reaktionsgeschwindigkeit werden aber wieder die thermodynamischeren Produkte favorisiert; wobei der reaktive Lanthan-triflatkomplex für die Entstehung des kinetischen Produktes sorgt.

Auf der anderen Seite lieferte die Reaktion mit Kupferacetat mit der langsamsten Geschwindigkeit (drei Monate) die höchste Selektivität zugunsten des **Isomers bei 6,7 min**, welches sich damit als das **thermodynamische Hauptisomer** herausstellt. Dabei liegt die Reaktionsselektivität mit Sicherheit höher, als das in Abb.122 gezeigte Chromatogramm des isolierten Produktes vermuten lässt, denn es handelte sich hierbei um den ersten Versuch, bei dem es zu Schwierigkeiten bei der Auflösung des Komplexes kam. Wie schon erwähnt, war die Zyklisierung zum Zeitpunkt der Aufarbeitung noch nicht vollständig, deshalb war das erste Ziel, so schnell wie möglich und damit noch vor der TIPS- Entschützung, nicht zyklisiertes Edukt abzutrennen. In der analytischen HPLC war neben den scharf laufenden Edukt- und Produktbanden auch noch ein breiter „Schmierer“ zu sehen, der aber aufgrund der mangelnden Quantifizierbarkeit nicht so groß war, dass er eine präparative Aufreinigung verhindert hätte. Erst während der präparativen HPLC wurde offensichtlich, dass ein Großteil des Produktes noch als Kupferkomplex vorlag und durch die erhebliche Bandenverbreiterung so natürlich nicht vom Edukt abgetrennt werden konnte. Erst nach Vereinigen aller Fraktionen, einrotieren und erneuter EDTA- Extraktion konnte eine saubere präparative Trennung erreicht werden. Dabei zeigte sich allerdings, dass kaum mehr Edukt vorhanden war. Schon während der ersten Untersuchungen zur IMDA war aufgefallen, dass die Zyklisierung bei Raumtemperatur nach einigen Stunden auch ohne Metall in den HPLC- Probelösungen ablief, welche Methanol und Wasser mit 0.1% Ameisensäure enthielten. Somit stammt der **größte Anteil des unerwünschten Nebenisomeres (9min) nicht von der Zyklisierung am Kupferkomplex, sondern vom Einrotieren der HPLC- Fraktionen**. Dadurch müsste sich bei optimierter Aufarbeitung eine noch bessere Selektivität erzielen lassen.

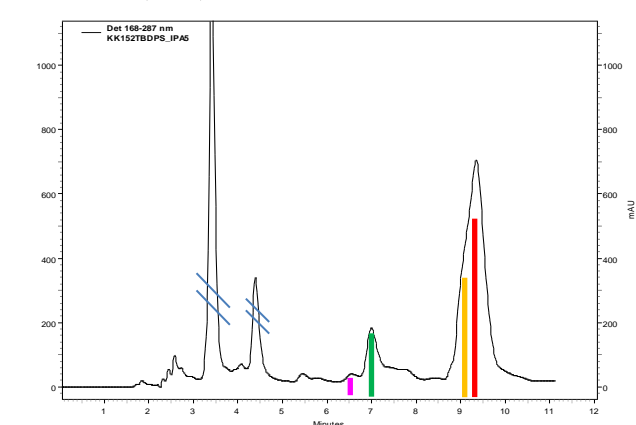
TIPS-La(OTf)₃: Nebenisomere bei 6,7 und 8,6; bei 8 kaum vorhanden



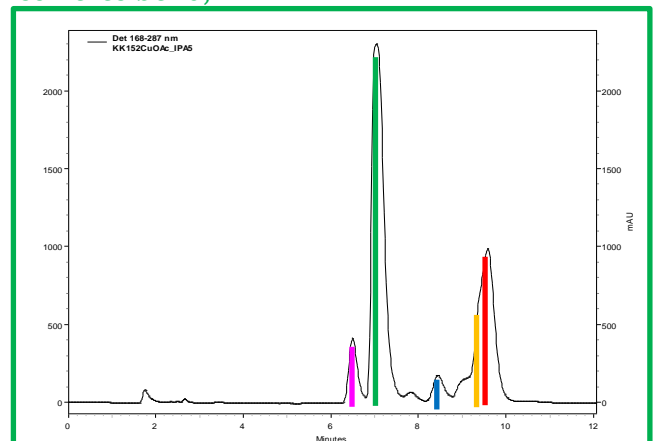
Me₂AlCl: Isomer bei 8,0 zweitgrößtes, bei 6,7 gering



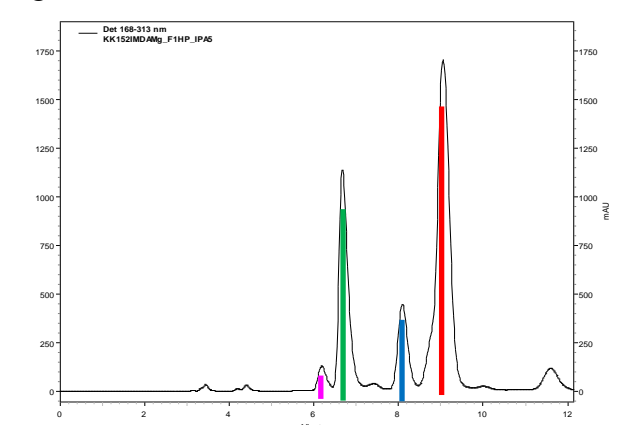
TBDPS-La(OTf)₃: schlechtere Selektivität⁷¹



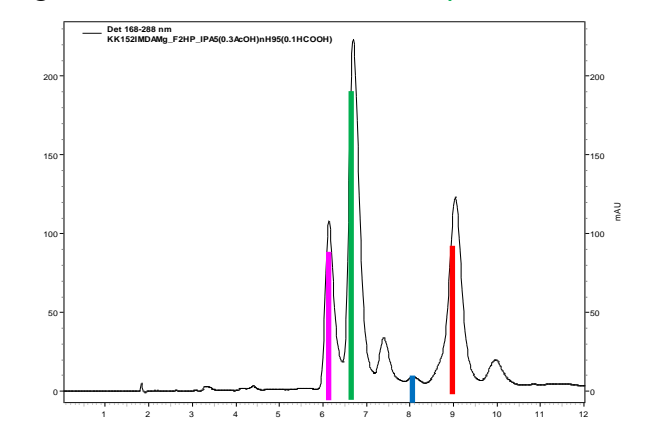
Cu(OAc)₂: beste Selektivität zugunsten des Isomeres bei 6,7



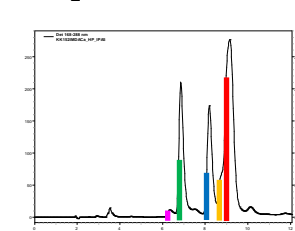
MgBr₂_F1HP⁷² viel von 6,7



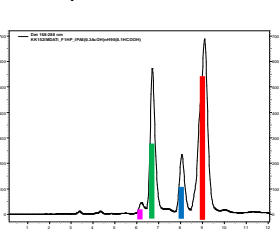
MgBr₂_F2HP viel von 6,1 und hauptsächlich 6,7



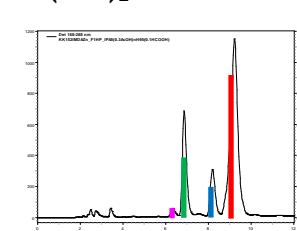
CaCl₂



TiCl₄



Cu(OTf)₂



ZnCl₂

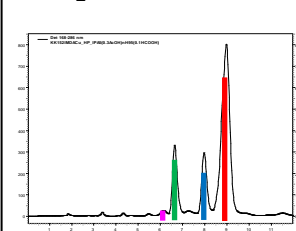


Abb.122: chirale HPLC- Chromatogramme der Diastereomerenmischungen von 234

Um die Synthese auch praktikabler zu gestalten, müssten aber auch noch die Reaktionsbedingungen so optimiert werden, dass das **thermodynamische Isomer am Kupferkomplex** schneller als nach drei Monaten erhalten werden kann. Ein Vorschlag dazu wäre ein leichtes Erwärmen der Reaktionslösung. Wenn dabei die Induktion geringer werden sollte, könnte man noch einmal die TBDPS- Schutzgruppe versuchen. Dabei muss die optimale Temperatur für maximale Reaktionsgeschwindigkeit und minimale unselektive Zyklisierung gefunden werden. Dabei wäre zunächst ein vollständiger Umsatz wünschenswert. Kann dies nicht erreicht werden, muss eine Methode für die Abtrennung von nicht zyklisiertem Edukt erarbeitet werden. Für eine HPLC- Trennung muss zunächst der Kupferkomplex ohne weitere Zyklisierung gespalten werden. Dies könnte man mit einem besseren Chelat- Bildner erreichen.

Ein wichtiger Aspekt ist der Vergleich der Zyklisierungen mit Me_2AlCl und $\text{La}(\text{OTf})_3$. Beides sind reaktive Komplexe, wodurch selektiv vor allem das kinetische Produkt entsteht. Der Einfluss der Metallzentren zeigt sich in den Nebenisomeren, welche invers entstehen. Dafür spricht auch der mit -63° geringere Drehwert des $\text{La}(\text{OTf})_3$ - zyklisierten **234** gegenüber dem Me_2AlCl zyklisierten **234** mit -107° . Der hohe **negative Drehwert des kinetischen Hauptproduktes** wird gewissermaßen um den **positiven Drehwert des thermodynamischen Nebenproduktes** reduziert.

Weiterhin sieht man in Abb. 122, dass nach der Zyklisierung mit MgBr_2 und MgCl_2 (das Chlorid hatte sich auch nach Tagen überhaupt nicht gelöst und es war auch keine Zyklisierung zu beobachten, also gaben wir in dieselbe Mischung noch den besser löslichen Bromid-Diethyletheratkomplex), trotz des laut IR selektiv gebildeten Ketokomplexes, eine ziemlich gleichmäßig verteilte Mischung aus vier Diastereomeren entstanden war, die auf der präparativen HPLC in zwei Fraktionen angereichert wurde. Die restlichen vier Lewissäuren lieferten eine untereinander ähnliche unselektive Diastereomerenmischung.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass für die Steroselektivität der untersuchten IMDA die folgenden Parameter entscheidend sind:

1. Sterik zur Induktion:

- a. Tetramsäuren mit kleinen Substituenten an 5-Position von Methyl bis Benzyl liefern keine Stereoinduktion. Weiterhin findet in diesen Systemen spontane Zyklisierung ohne Katalysator statt.
- b. Die zwei Stereozentren vom Threonin in Verbindung mit der TIPS- Gruppe liefern eine gute Stereoinduktion. Spontane Zyklisierung ohne Katalysator findet nicht statt.
- c. Die TBDPS- Gruppe führt durch besonders starke sterische Hinderung zu deutlich reduzierter Reaktionsgeschwindigkeit.

2. Komplexgeometrie (Keto- versus Amidorientiert)

- a. Reaktive Lewissäuren bilden durch ihren starken Elektronenmangel bevorzugt den Komplex mit dem elektronenreicheren Amid- Carbonyl- Sauerstoffatom und umgekehrt.
- b. Am Amidkomplex bildet sich das kinetische Diastereomer. Am Ketokomplex bildet sich mit langsamer Reaktionsgeschwindigkeit das thermodynamische Diastereomer.
- c. Die Komplexgeometrie hängt sowohl vom Metall, als vom Gegenion ab. Der Vergleich zwischen $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ und $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ zeigt, dass Kupfer offenbar eine starke Tendenz zur Bildung des Ketokomplexes hat. Die Reaktion mit $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ verläuft nicht selektiv, da möglicherweise das im Ketokomplex bevorzugte thermodynamische Produkt und das vom reaktiven Triflat favorisierte kinetische Produkt miteinander konkurrieren.

3. Reaktivität der Lewis- Säure:

- a. An diesem System verläuft die IMDA auch mit reaktiven Katalysatoren wie Me_2AlCl nur zwischen 0°C und Raumtemperatur ab, nicht bei -78°C , wie im analogen Evans- Auxiliar- System.
- b. Mit reaktiven Lewissäuren wird mit relativ hohen Reaktionsgeschwindigkeiten das kinetische Produkt gebildet.

Um auf diesem Wege das natürliche Methiosetin herzustellen, wäre es als nächstes wichtig,

1. die Zyklisierung mit $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ unter optimierter Aufarbeitung zu wiederholen,
2. die Zyklisierung mit $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ am TBDPS- geschützten Substrat durchzuführen und
3. von beiden Produkten die Octalinsäure zur Analyse abzuspalten.

4.5.3 veröffentlichte Version

Zunächst sollte aber das angefangene Manuskript möglichst schnell und innerhalb der zwei-Monatsfrist für die Revision publiziert werden. Dazu hat Markus erfolgreich die oxidative Spaltung unseres mittels Lanthantriflat zyklisierten Allo- Methiosetines durchgeführt und somit bewiesen, dass **248**, hergestellt durch Zyklisierung unter Induktion durch Evans-Auxiliar identisch ist mit **248** aus der oxidativen Spaltung.

Markus Winterer, Karl Kempf and Rainer Schobert, **Synthesis of an Isomer of the Decalinoyltetramic Acid Methiosetin by a Stereocontrolled IMDA Reaction of a Metal-Chelated 3-Trienoyltetramate**

J. Org. Chem., **2016**, *81*, 7336-7341.

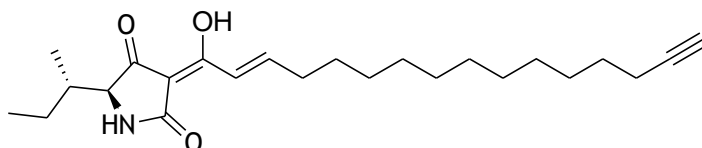
4.6 Liste der eigenen Veröffentlichungen

1. Barnickel B., Bayliffe F., Diestel R., Kempf K., Laschat S., Pachali S., Sasse F., Schlenk A., Schobert R. **Structure-Activity Relationships of Precursors and Analogs of Natural 3-Enoyl-tetramic Acids.**
Chem. Biodiv. **2010**, *7*, 2830.
2. Loke I., Park N., Kempf K., Jagusch C., Schobert R., Laschat S. **Influence of steric parameters on the synthesis of tetramates from α -amino- β -alkoxy-esters and Ph_3PCCO**
Tetrahedron, **2012**, *68*, 697.
3. Kempf K., Raja A., Sasse F., Schobert R. **Synthesis of Penicillenol C₁ and of a Bis-Azide Analogue for Photoaffinity Labeling**
J. Org. Chem. **2013**, *78*, 2455.
4. Kempf O., Kempf K., Bombarda E., Ullmann G.M., Schobert R.
Patent Hydroadabcyll (wasserlöslicher Farbstoff):
Patent No. 14197181.2-1451
5. Kempf K., Schmitt F., Bilitewski U., Schobert R. **Synthesis, stereochemical assignment, and bioactivity of the *Penicillium* metabolites penicillenols B1 and B2**
Tetrahedron, **2015**, *71*, 5064.
6. Posterpräsentation (18.8.2015) auf der 250. nationalen Konferenz der Amerikanischen Chemischen Gesellschaft (ACS) in Boston, Massachusetts, USA: **First Synthesis of Penicillenol B1, B2, C1 and a Bis-Azide Analogue for Photoaffinity Labeling**
7. Winterer M.*, Kempf K.*, Schobert R., **Synthesis of an Isomer of the Decalinoyltetramic Acid Methiosetin by a Stereocontrolled IMDA Reaction of a Metal-Chelated 3-Trienoyltetramate**
J. Org. Chem. **2016**, *81* (17), 7336. * = equal contribution

5. Experimentelle Daten

5.1 Alkine

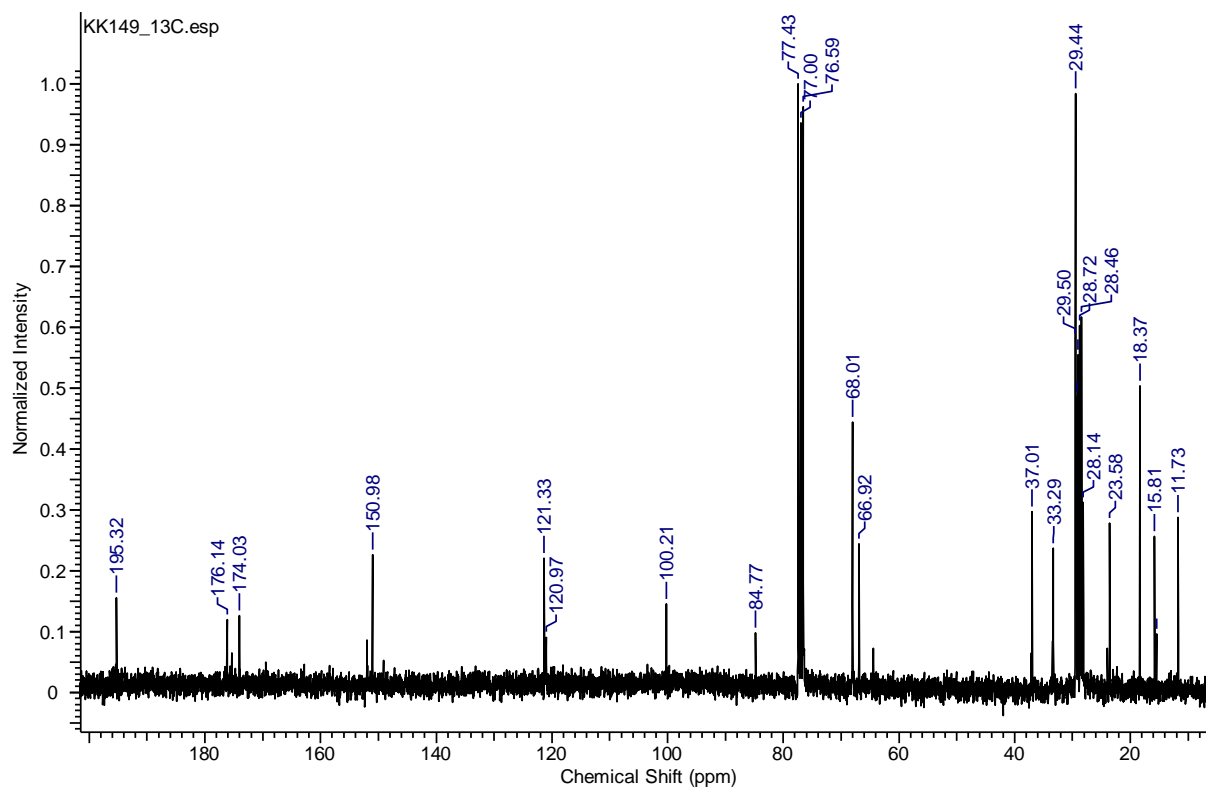
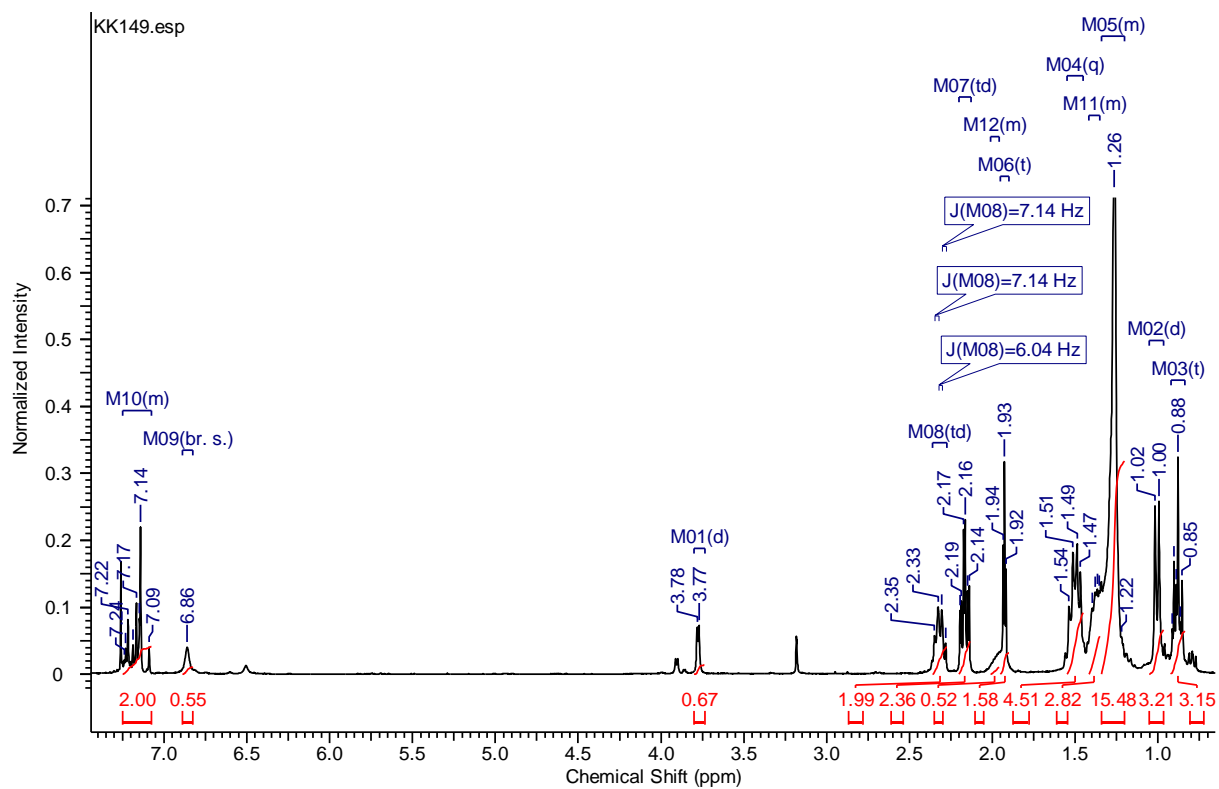
(S)-5-sec-butyl-3-((E)-1-hydroxyhexadec-2-en-15-ynylidene)pyrrolidine-2,4-dione 117

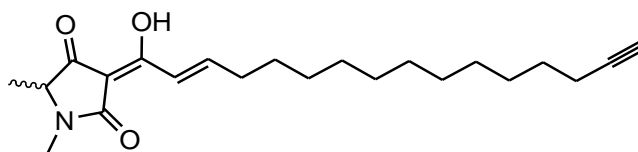


General Procedure 1 for the Wittig- Olefination of the tetramic acid 3-acyl-ylides:

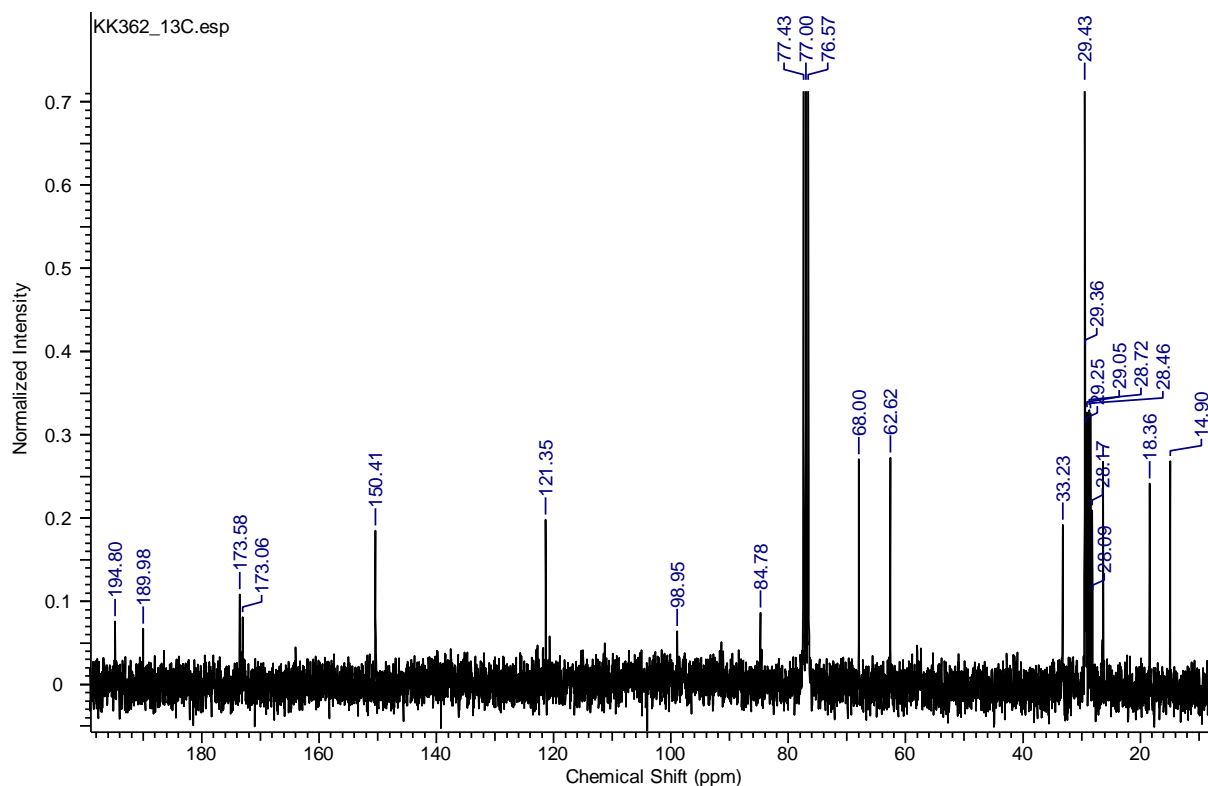
Ylide is dissolved in THF and 1.1 eq. of KOtBu is added which leads to a bathochromic shift of the solution. Upon complete dissolution of the base, 1.1 eq. of the respective aldehyde is added and the mixture is heated to reflux over night. After removal of the solvent *in vacuo*, the remainder is taken up in CH₂Cl₂ and extracted with dilute aqueous NaHSO₄. The solvent is evaporated and the crude product purified by reversed phase HPLC.

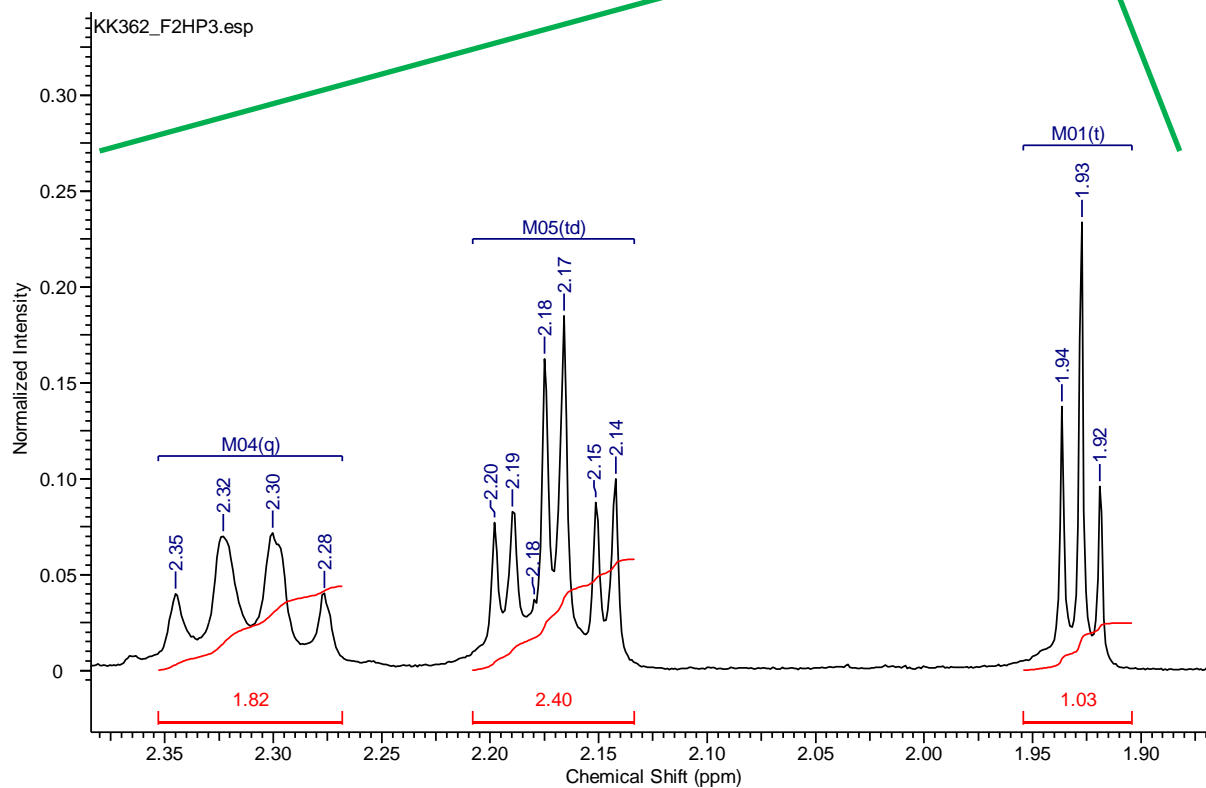
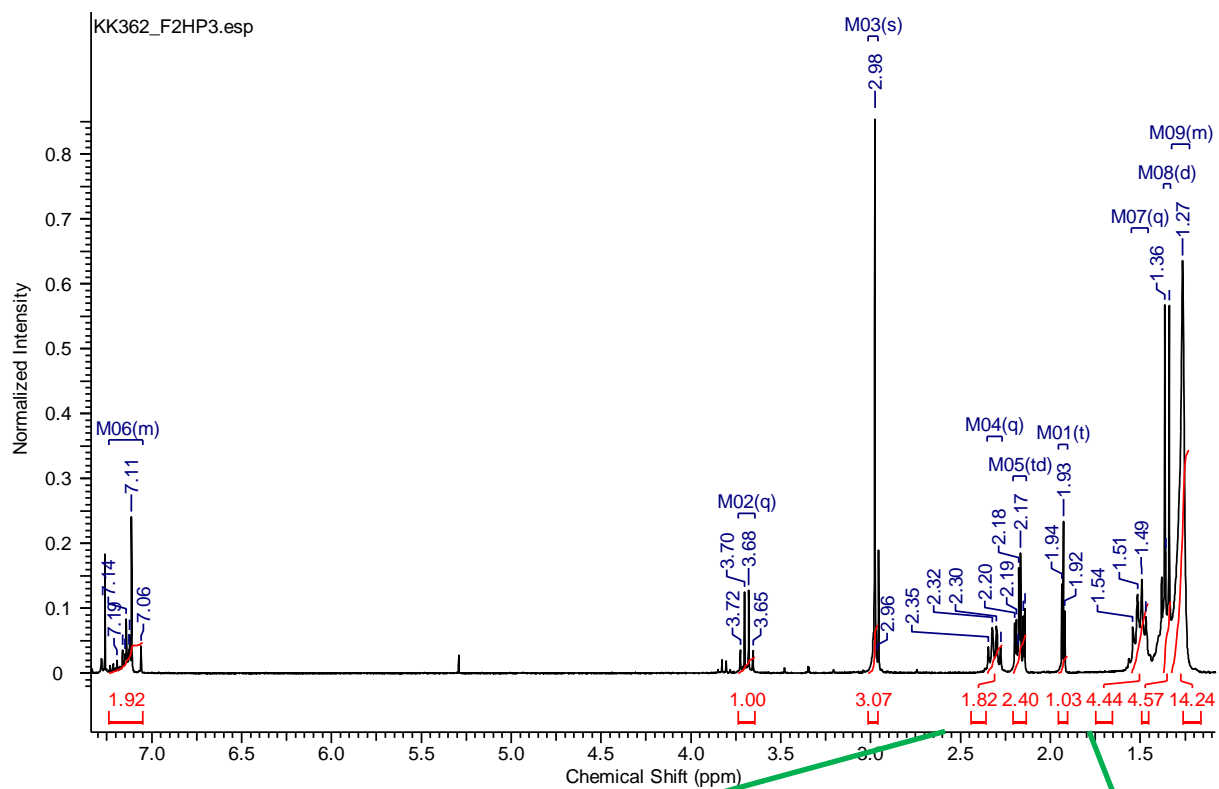
IR (ATR) ν_{max} 3265 (br), 2961, 2925, 2855, 1694, 1646, 1580, 1458, 1436, 1293, 1225, 1101, 986, 895, 633 cm⁻¹; ¹H-NMR (300 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.88 (t, *J*=7.4 Hz, 3 H), 1.01 (d, *J*=6.9 Hz, 3 H), 1.20 - 1.34 (m, 14 H), 1.35 - 1.42 (m, 2 H), 1.50 (q, *J*=6.9 Hz, 4 H), 1.93 (t, *J*=2.6 Hz, 1 H), 1.96 - 2.01 (m, 1 H), 2.17 (td, *J*=7.0, 2.5 Hz, 2 H), 2.32 (td, *J*=7.1, 6.0 Hz, 1 H), 3.78 (d, *J*=3.3 Hz, 1 H), 6.86 (br. s., 1 H), 7.08 - 7.25 (m, 2 H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ ppm 11.7, 15.8, 18.4, 23.6, 28.1, 28.5, 28.7, 29.1, 29.3, 29.35, 29.4, 29.4, 29.5, 33.3, 37.0, 66.9, 68.0, 84.8, 100.2, 121.3, 151.0, 174.0, 176.1, 195.3; MS (ESI-): *m/z*= 386.3 [M-H]⁻; HRMS (ESI) *m/z*: [M+H]⁺ calcd for C₂₄H₃₈NO₃⁺ 388.2846, found 388.2843.



**General Procedure 1**

IR (ATR) ν_{max} 3299, 3276, 2926, 2854, 1705, 1644, 1579, 1484, 1445, 1404, 1368, 1303, 1266, 1238, 1160, 1069, 987, 928, 626, 607, 554 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHCl_3 - d) δ ppm 1.23 - 1.32 (m, 14 H), 1.35 (d, $J=6.9$ Hz, 3 H), 1.50 (q, $J=7.1$ Hz, 4 H), 1.93 (t, $J=2.7$ Hz, 1 H), 2.17 (td, $J=7.1, 2.7$ Hz, 2 H), 2.31 (q, $J=6.9$ Hz, 2 H), 2.98 (s, 3 H), 3.69 (q, $J=6.9$ Hz, 1 H), 7.05 - 7.24 (m, 2 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) 14.9, 18.4, 26.6, 28.2, 28.5, 28.7, 29.1, 29.3, 29.36, 29.43, 29.45, 29.5, 33.2, 62.6, 68.0, 84.8, 99.0, 121.4, 150.4, 173.1, 173.6, 190.0; HRMS (ESI) m/z : $[\text{M-H}]^-$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{NO}_3^-$ 358.2377, found 358.2391; $[\text{M+H}]^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{NO}_3^+$ 360.2533, found 360.2530.





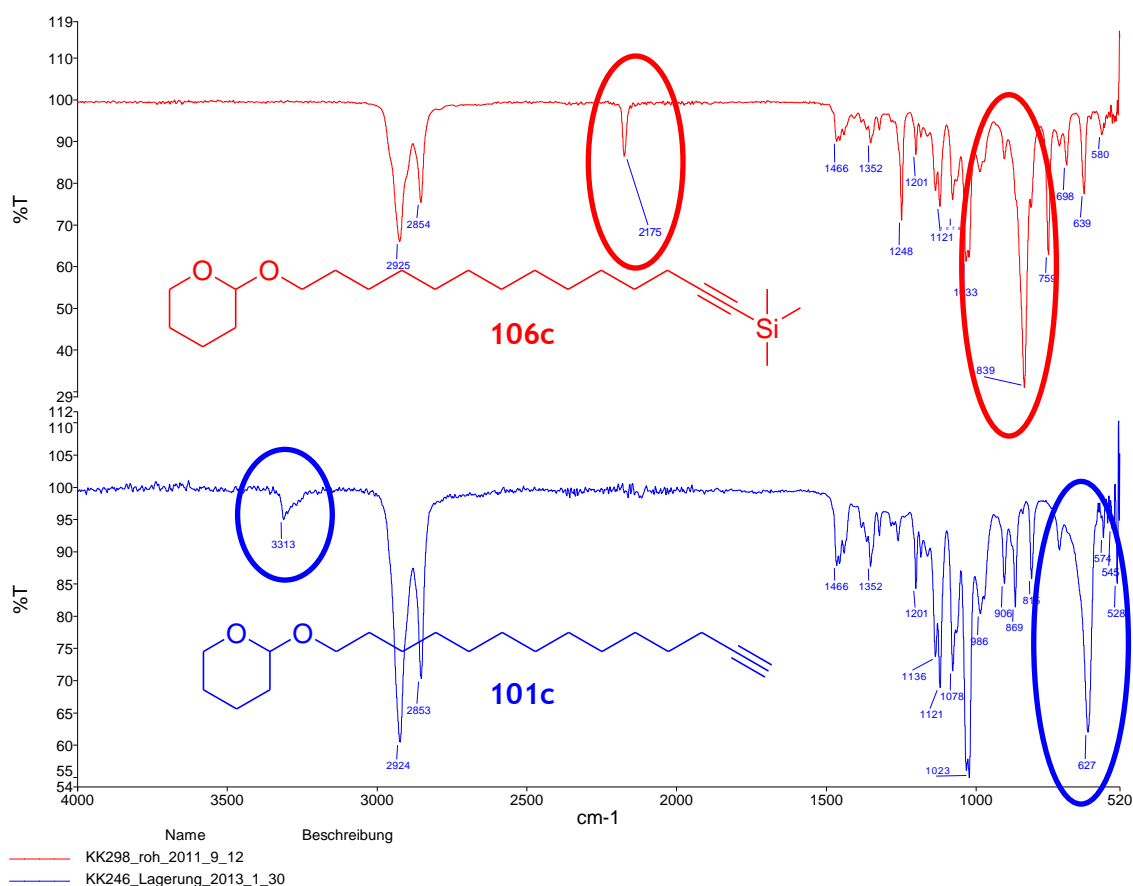
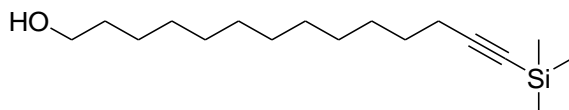


Abb.122: Im IR kann man das terminale Alkin **101** gut an den beiden C-H- Schwingungen bei 3313 und 627 cm⁻¹ erkennen. Nach der Silylierung verschwinden beide Signale und es erscheinen stattdessen die C≡C-Si- Schwingung bei 2175 cm⁻¹ und die Si-C-H- Schwingung bei 839 cm⁻¹.

14-(trimethylsilyl)tetradec-13-yn-1-ol **107c**⁴⁵

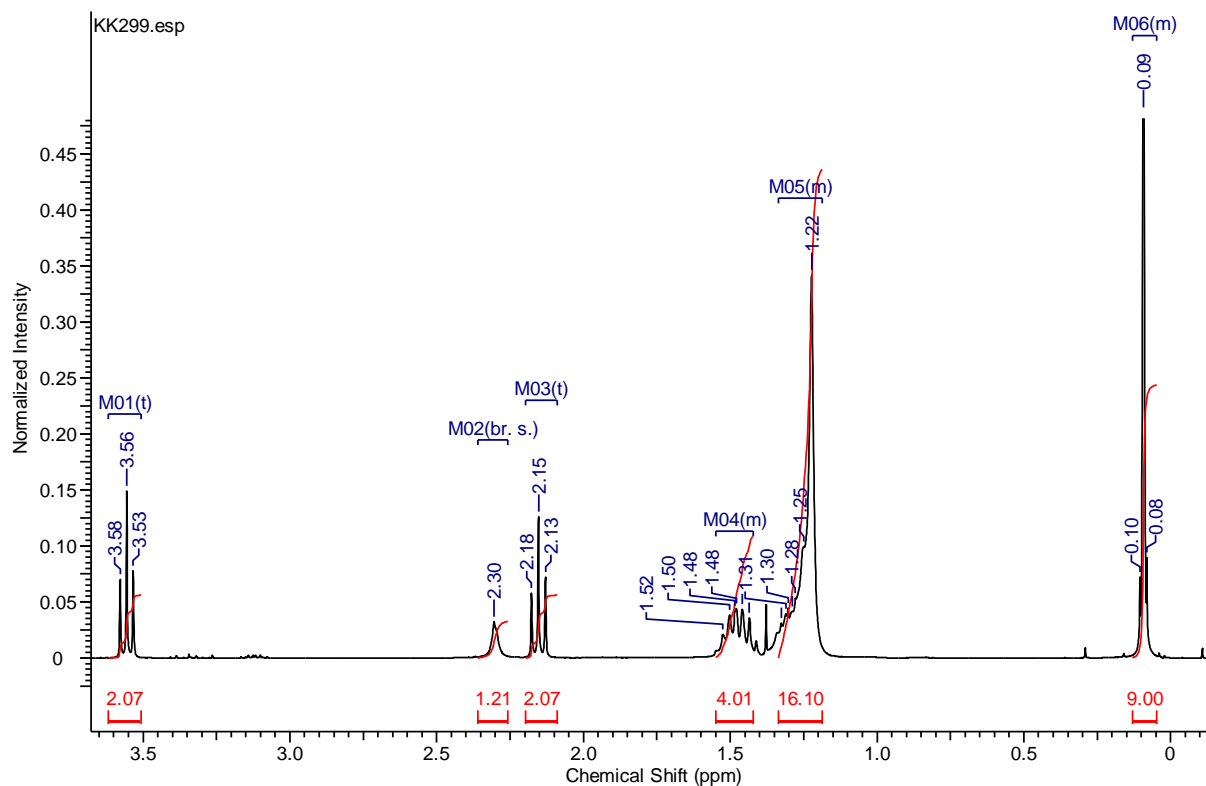


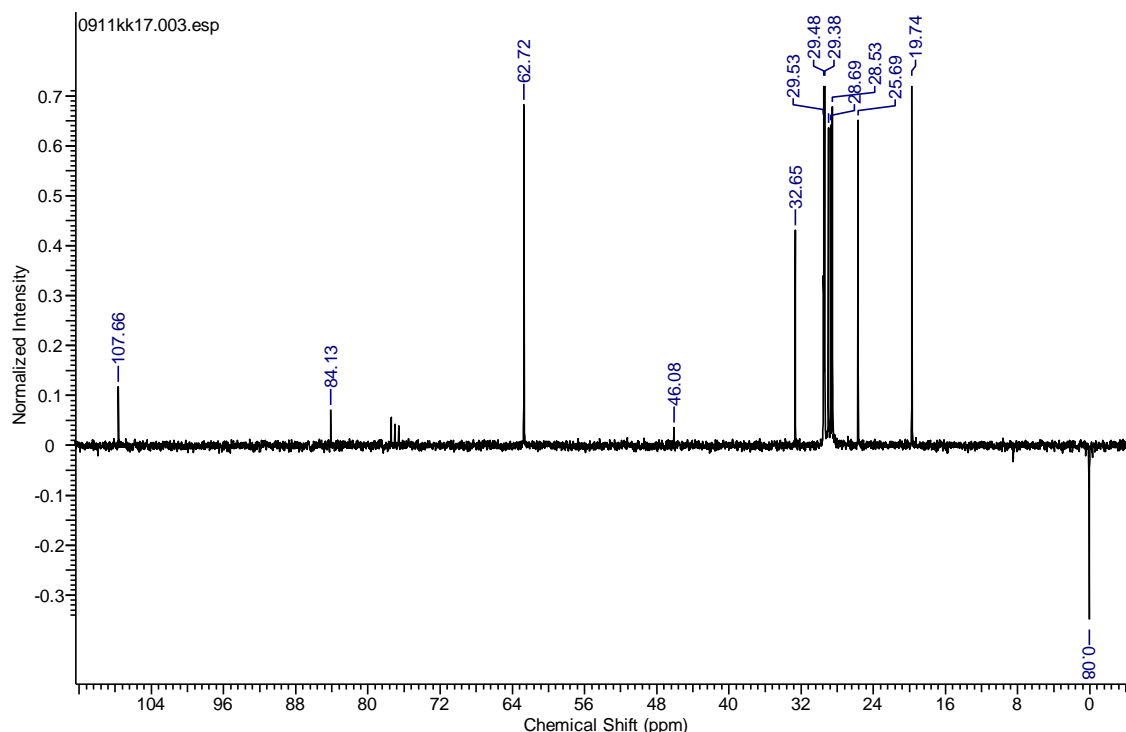
Tetrahydro-2-(tetradec-13-ynyloxy)-2H-pyran⁷³ **101c** (1.47 g, 5.0 mmol) was dissolved in 50 mL THF under exclusion of air and moisture. The solution was cooled to -78 °C and *n*BuLi (1.5 M, 3.7 mL, 5.5 mmol, 1.1 eq) was added dropwise over 10 min. Then TMSCl (0.76 mL, 6 mmol, 1.2 eq.) was added slowly and the mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 4 h. Thereafter it was cooled to 0 °C and partitioned between Cyclohexane and water. The water phase was extracted three times with Cyclohexane and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and evaporated *in vacuo*.

The crude product was dissolved in MeOH and a few crystals of pTosOH were added. The solution was stirred at room temperature until TLC showed absence of starting material (~1h). Then it was basified by addition of 0.5 mL NEt₃ and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by SiO₂ column chromatography (R_f **106c** 0.67; **107c**

0.17;nHexane/diethylether 5:1) to afford 1.25 g (4.4 mmol, 89% after two steps) of the title compound as white crystals.

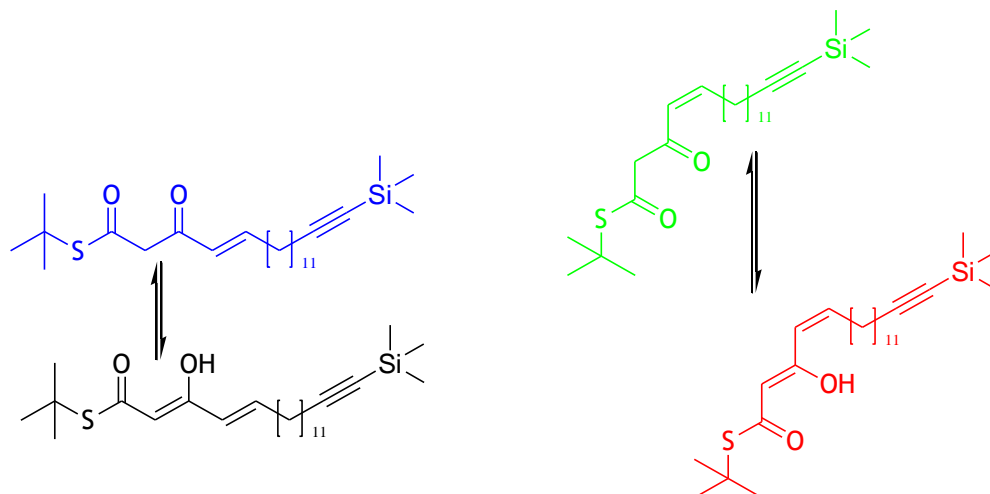
IR (ATR) ν_{\max} 3345 (br), 2925, 2854, 2175, 1464, 1248, 1054, 838, 759, 697, 639; ^1H -NMR (300 MHz, CHCl_3 -d) δ ppm 0.05 - 0.13 (m, 9 H), 1.19 - 1.34 (m, 16 H), 1.42 - 1.55 (m, 4 H), 2.15 (t, $J=7.1$ Hz, 2 H), 2.30 (br. s., 1 H), 3.56 (t, $J=6.6$ Hz, 2 H); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) 0.1, 19.7, 25.7, 28.5, 28.7, 29.0, 29.4, 29.47, 29.50, 29.53, 32.7, 46.1, 62.7, 84.1, 107.7.





(E)-S-tert-butyl 18-(trimethylsilyl)-3-oxooctadec-4-en-17-ynethioate 112

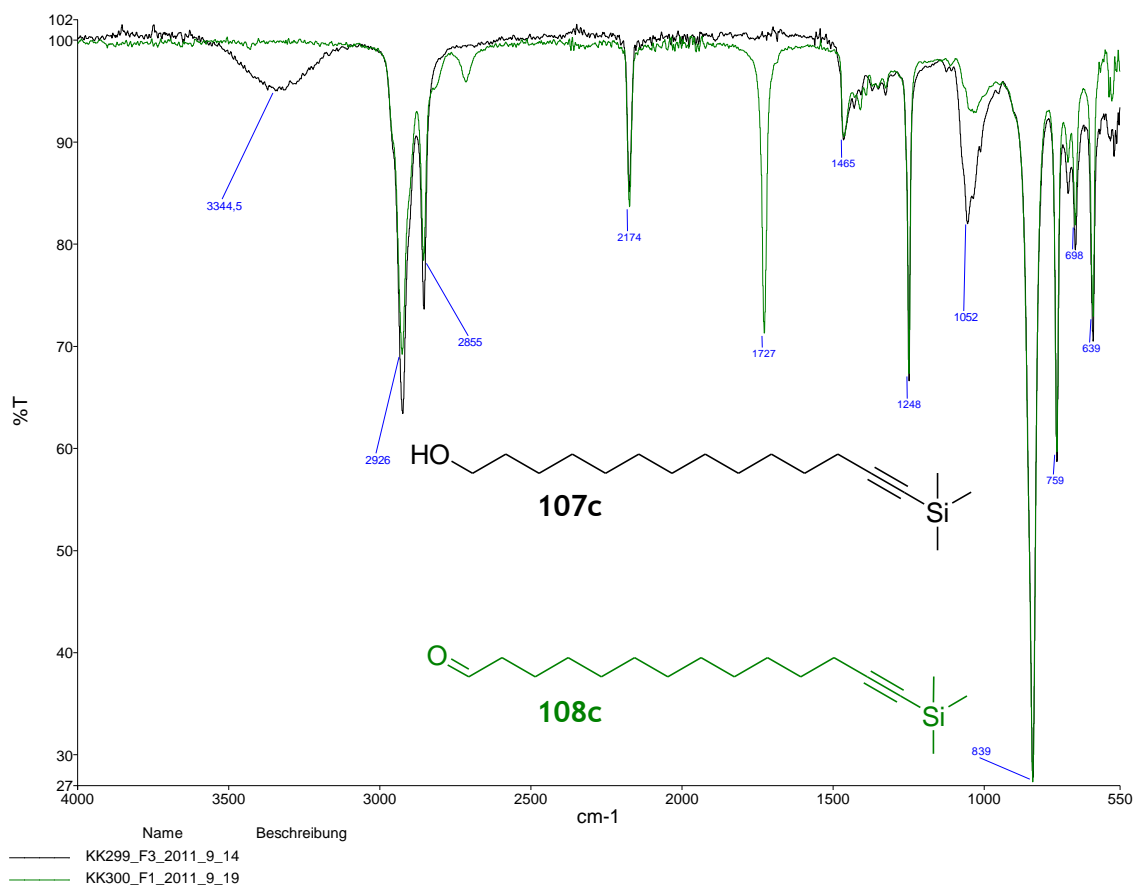
Keto: Enol ~ 3: 10 (CDCl₃, RT); E: Z ~ 10: 1

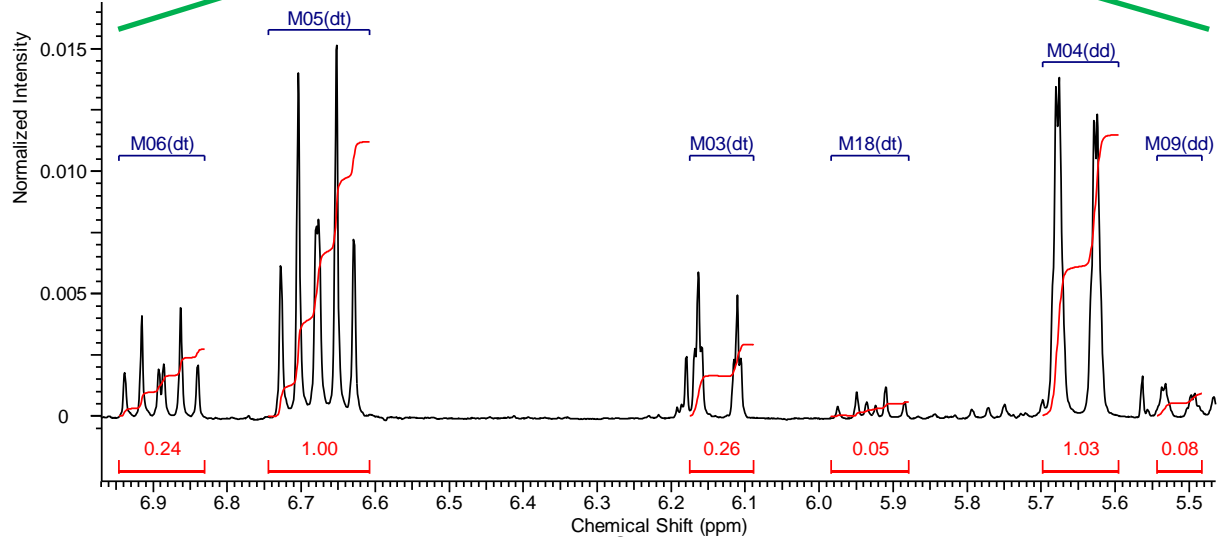
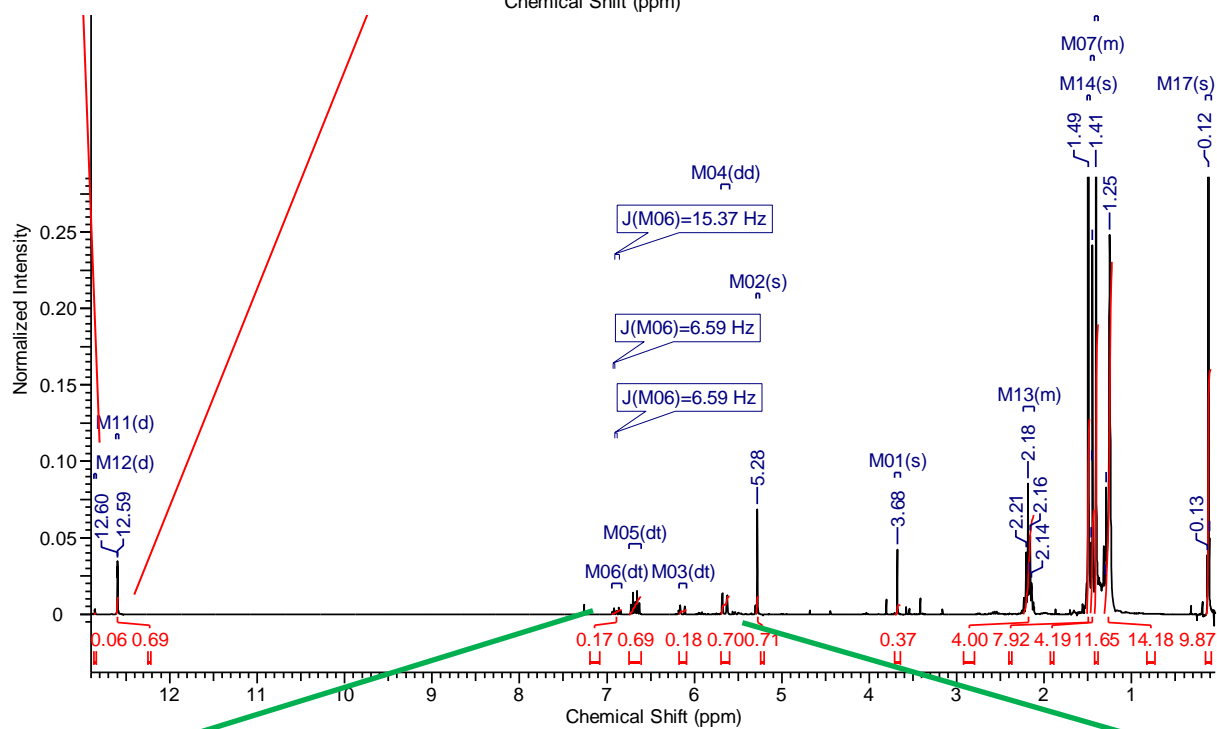
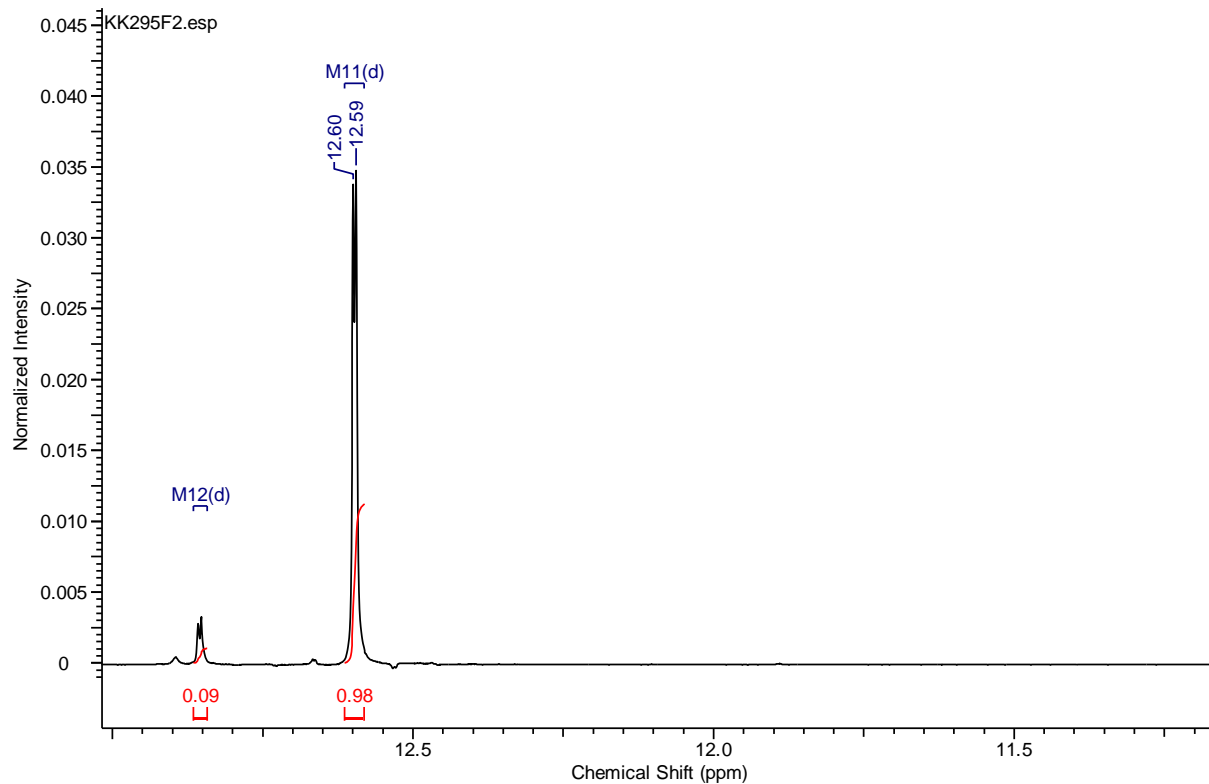


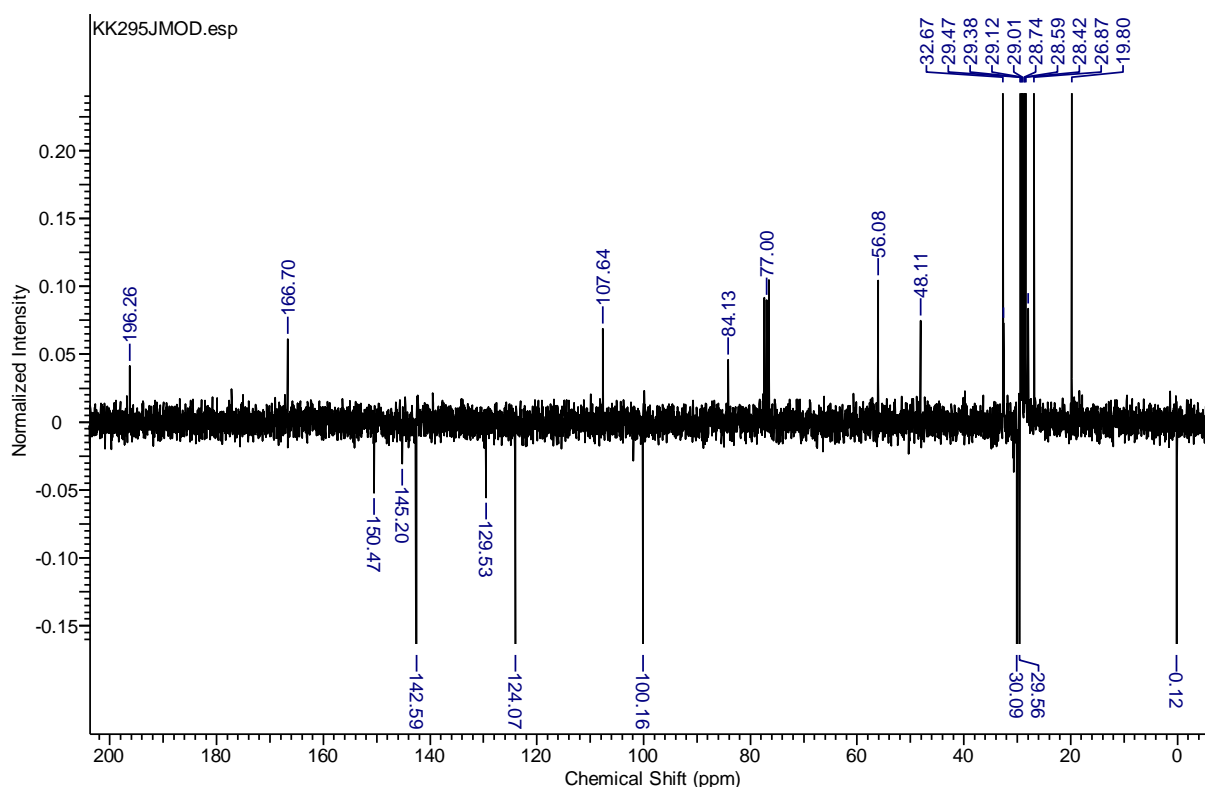
1.0 g PCC (4.6 mmol, 1.1eq.) was suspended in 18 mL of CH₂Cl₂ and a solution of **107c** (1.19 g, 4.2 mmol) in 6 mL of CH₂Cl₂ was added dropwise⁴¹. After stirring for 2 h at room temperature, the mixture was diluted with 200 mL of diethylether and filtered over celite to remove inorganic precipitates. The solution was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by SiO₂ column chromatography (hexane-diethylether 5:1, R_f 0.63) to afford 0.92 g (3.3 mmol, 78%) of aldehyde **108c** as white crystals.

To a stirred solution of S-tert-butyl 3-(ethoxyphosphono)-2-oxopropanethioate⁷⁴ (1.43 g, 4.6 mmol, 1.4 eq.) in THF (25 mL) at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ was added *n*-butyllithium (5.85 mL, 1.5 M, 8.78 mmol, 2.7eq.) dropwise *via* syringe, slowly over 10 min. The resultant yellow solution was stirred at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ for a further 15 min, before a solution of **108c** (0.92 g, 3.3 mmol, 1.0eq.) in THF (12 mL) was added dropwise *via* syringe. The reaction mixture was stirred at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min, warmed to rt, and stirred for another hour. The residual solution was quenched with ammonium chloride, then partitioned between water and diethyl ether. The combined organics were washed further with water (3×20 mL), brine, dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated *in vacuo*. Purification of the crude product over silica gel afforded 1.39 g (3.2 mmol, 70%) of the title compound (R_f of main isomer 0.75, Cyclohexane/ Ethylacetate 10:1) as a colourless oil.

IR (ATR) ν_{max} 2925, 2853, 2175, 1655, 1583, 1453, 1407, 1364, 1330, 1248, 1183, 1075, 968, 839, 759, 696, 671, 639; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.12 (s, 9 H, SiMe_3), 1.22 - 1.31 (m, 16 H), 1.41 (s, 9 H, *t*Bu, E-Enol), 1.43 - 1.47 (m, 2 H, CH_2), 1.45 (s, 9 H, *t*Bu, Z-Enol), 1.49 (s, 9 H, *t*Bu, E-Keto), 2.11 - 2.24 (m, 4 H, CH_2), 3.68 (s, 2 H, SCOCH_2 , E-Keto), 3.81 (s, 2 H, COCH_2 , Z-Keto), 5.28 (s, 1 H, SCOCH , E-Enol), 5.30 (s, 1 H, COCH , Z-Enol), 5.51 (dd, $J=11.8$, 1.4 Hz, 1 H, CH_2CHCH , Z-Enol), 5.65 (dd, $J=15.6$, 1.4 Hz, 1 H, CH_2CHCH , E-Enol), 5.93 (dt, $J=11.8$, 7.4 Hz, 1 H, CH_2CH , Z-Enol), 6.14 (dt, $J=15.8$, 1.4 Hz, 1 H, CH_2CHCH , E-Keto), 6.68 (dt, $J=15.6$, 7.0 Hz, 1 H, CH_2CH , E-Enol), 6.89 (dt, $J=15.8$, 6.6 Hz, 1 H, CH_2CH , E-Keto), 12.60 (d, $J=1.4$ Hz, 1 H, OH, E-Enol), 12.85 (d, $J=1.4$ Hz, 1 H, OH, Z-Enol); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.2, 19.8, 26.9, 28.0, 28.5, 28.6, 28.8, 29.1, 29.2, 29.4, 29.5, 29.5, 29.6, 30.1, 32.6, 32.7, 48.1, 56.1, 84.2, 96.8, 100.2, 107.7, 124.1, 142.6, 150.5, 166.7, 196.3.

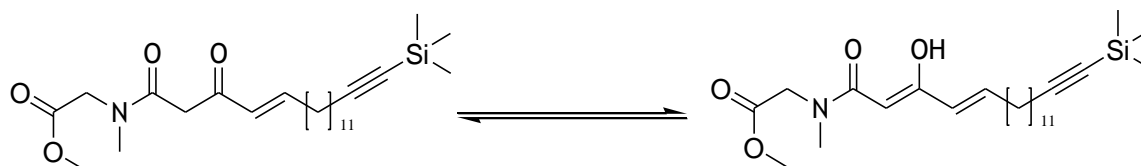






(E)-N-Methyl,N-methoxycarbonylmethyl-18-(trimethylsilyl)-3-oxooctadec-4-en-17-yneic-acid-amide 113

[Methyl- 2-(N-methyl-(18-(trimethylsilyl)-3-oxooctadec-4-en-17-yneoyl-amido)acetate]

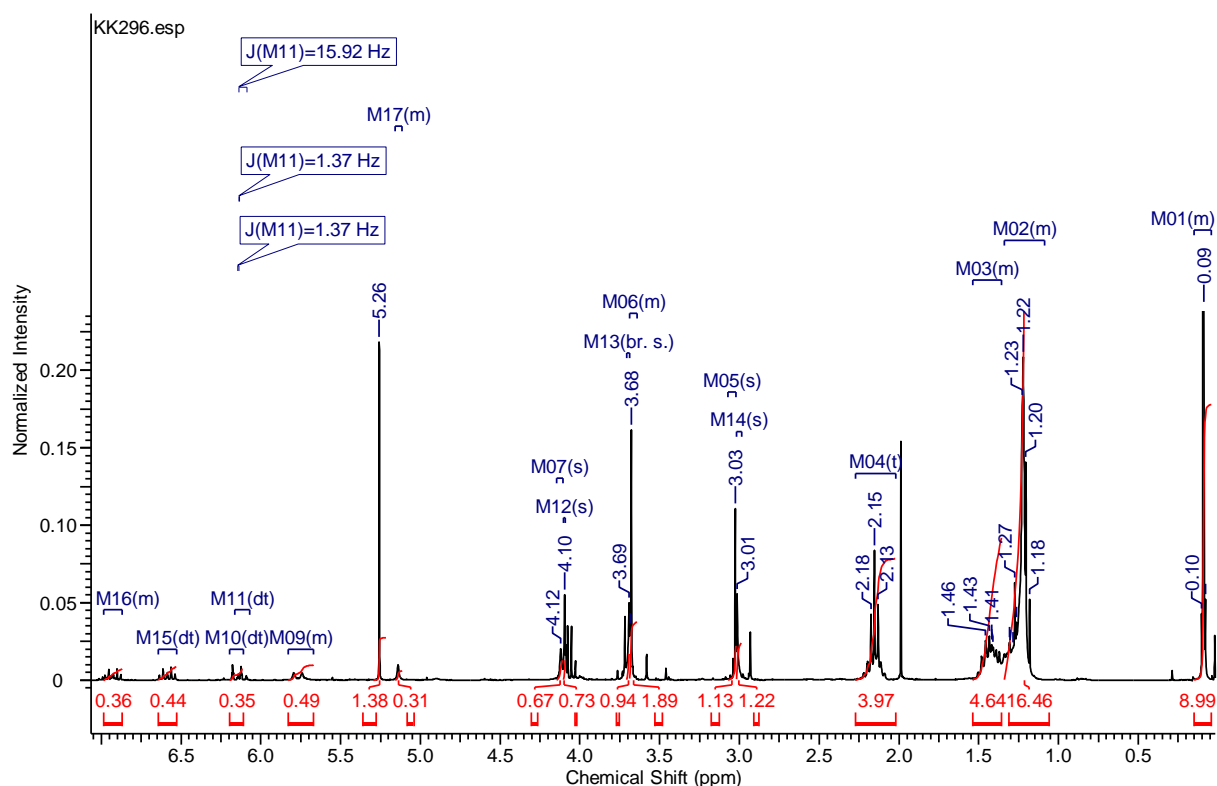


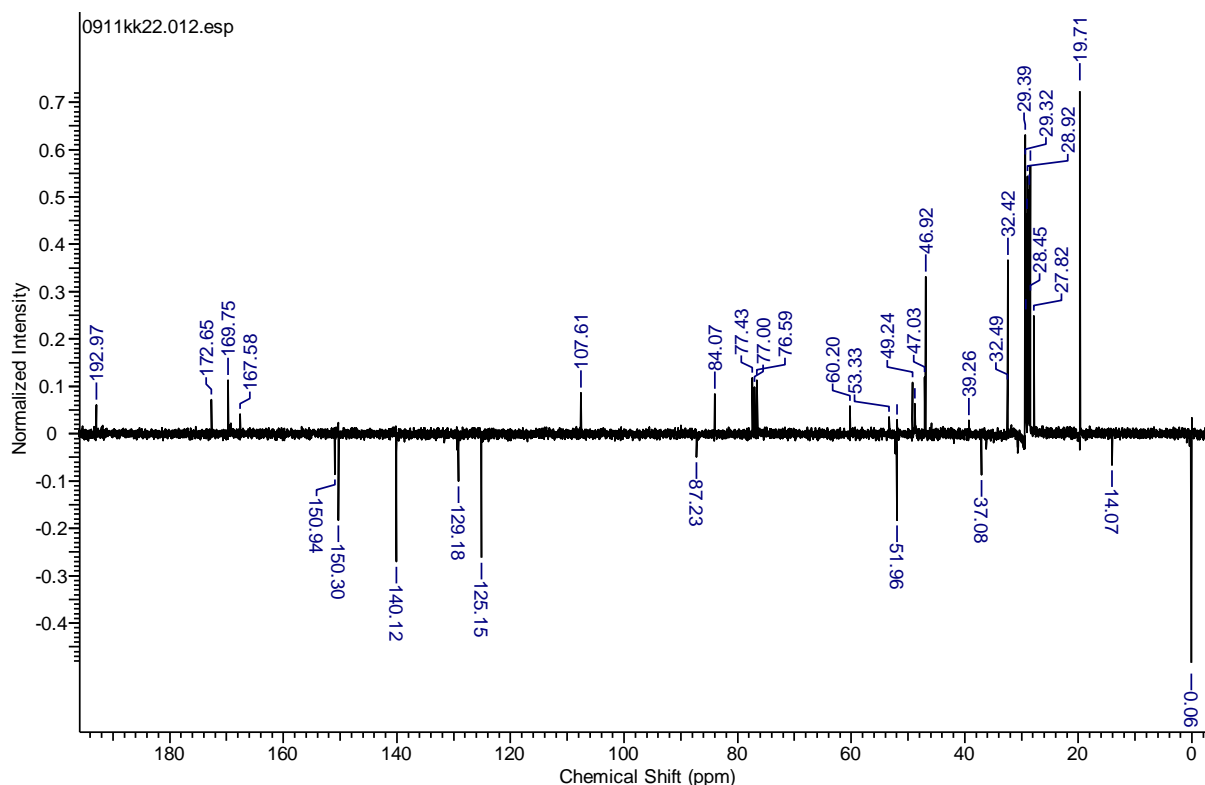
Keto: Enol ~ 1:2 (CDCl₃, RT); E:Z n.d. (¹H-NMR is complicated by a mixture of amide rotamers)⁴⁷

Sarcosine methyl ester hydrochloride (1.12 g, 8.0 mmol, 2.5 eq.) was suspended in a solution of **112** (1.39 g, 3.2 mmol) in THF (80 mL) at rt. The reaction mixture was cooled to 0°C before Triethylamine (2.22 mL, 16.0 mmol, 5 eq.) was added dropwise *via* syringe. Then silver trifluoro-acetate (1.4 g, 6.4 mmol, 2 eq.) was added in one portion. This mixture was stirred for a further 2 h then concentrated in vacuo. Purification by chromatography on silica gel [*R_f* (product) 0.22 (Cyclohexane/ EtOAc 3:1)] afforded the title compound **113** as a colourless oil (1.28 g, 2.9 mmol, 92%).

IR (ATR) ν_{max} 2926, 2855, 2173, 1751, 1657, 1594, 1492, 1366, 1248, 1207, 1139, 1044, 969, 839, 759, 698, 639, 576; ¹H-NMR (300 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.09 (s, 9 H), 1.09 - 1.34 (m, 16 H), 1.36 - 1.54 (m, 4 H), 2.15 (pseudoquint, *J*=7.0, 5.5 Hz, 4 H), 3.01 (s, 3 H, NMe),

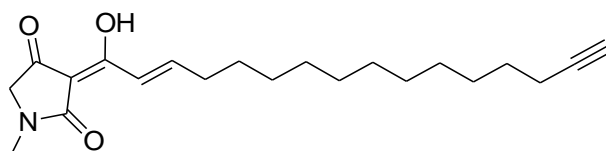
3.03 (s, 3 H, NMe), 3.68 (s, 2 H, CH₂N), 3.69 (s, 2 H, CH₂N), 4.10 (s, 2 H, CH₂CO, Keto), 4.12 (s, 2 H, CH₂CO, Keto), 5.14 (s, 1 H, COCHCOH, Enol), 5.26 (s, 1 H, COCHCOH, Enol), 5.77 (d, $J=15.1$ Hz, 1 H), 6.12 (dt, $J=15.9$, 1.4 Hz, 1 H, Keto), 6.15 (dt, $J=15.9$, 1.4 Hz, 1 H, Enol), 6.59 (dt, $J=15.4$, 7.1 Hz, 1 H), 6.87 - 7.02 (m, 1 H); ¹³C-NMR (75 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.1, 14.1, 19.7, 20.9, 27.8, 27.8, 28.4, 28.5, 28.6, 28.9, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 32.4, 32.5, 32.5, 37.1, 46.9, 47.0, 49.2, 51.9, 52.3, 53.3, 60.2, 84.1, 107.6, 125.1, 129.2, 140.1, 150.3, 167.6, 169.7, 172.6.





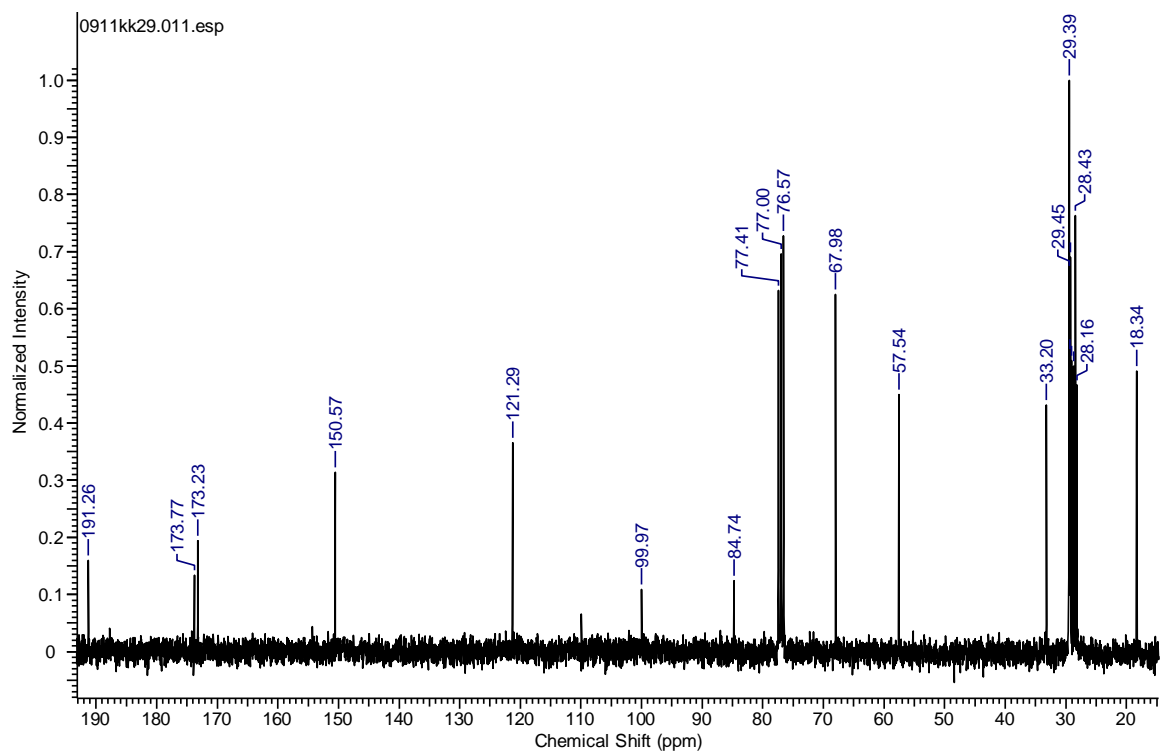
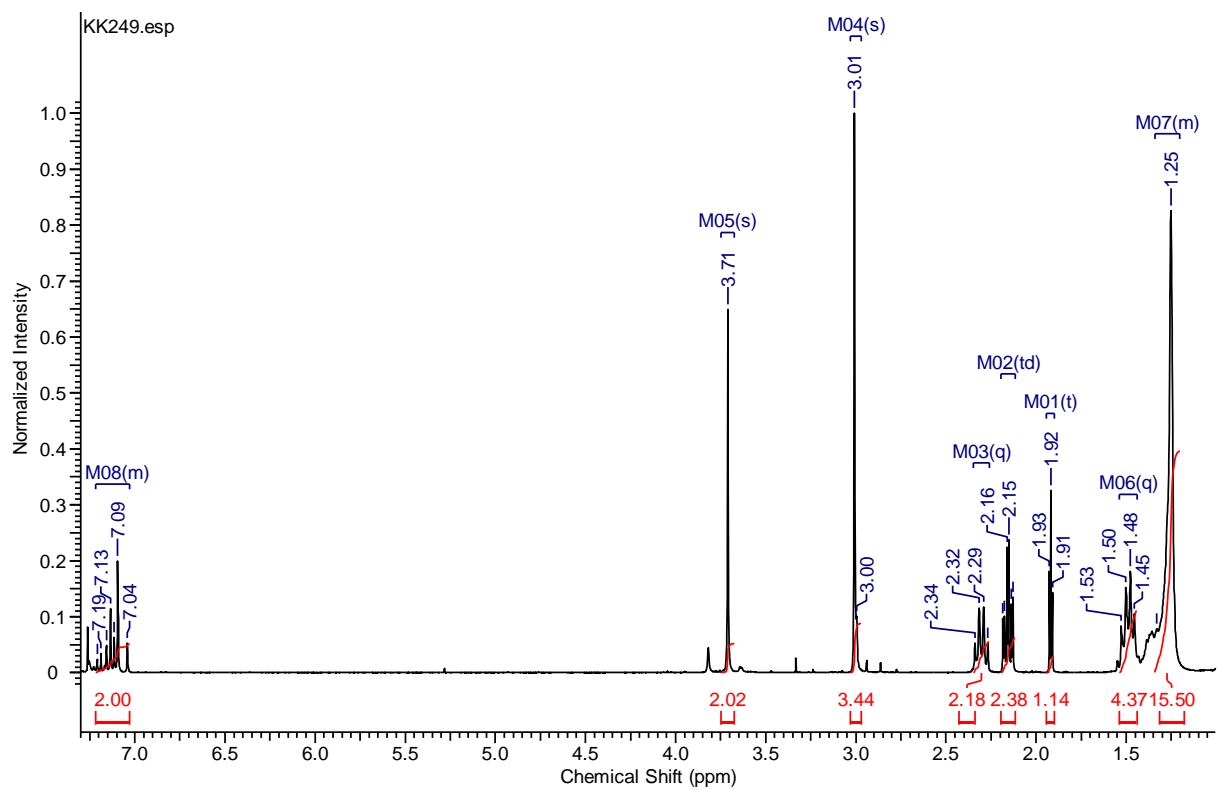
3-((E)-1-hydroxyhexadec-2-en-15-ynylidene)-1-methylpyrrolidine-2,4-dione

115

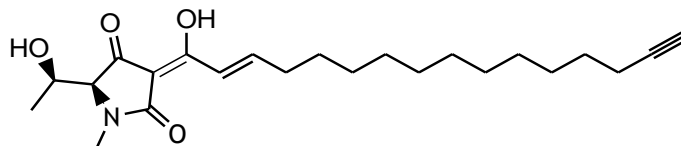


To a solution of ketoamide **113** in methanol at rt was added a solution of sodium methoxide (5 eq) in methanol *via* syringe. After 10 min the reaction was quenched by the addition of 1 N HCl. The mixture was then partitioned between water and CH₂Cl₂, and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic portions were dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to give the title compound in quantitative yield. For analytical purposes and biological tests **115** was purified by HPLC.

IR (ATR) ν_{max} 3304, 2924, 2853, 1710, 1651, 1610, 1494, 1455, 1400, 1246, 1043, 975, 927, 752, 719; ¹H-NMR (300 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.20 - 1.34 (m, 14 H), 1.49 (q, *J*=7.1 Hz, 4 H), 1.92 (t, *J*=2.6 Hz, 1 H), 2.16 (td, *J*=7.1, 2.6 Hz, 2 H), 2.30 (q, *J*=6.9 Hz, 2 H), 3.01 (s, 3 H), 3.71 (s, 2 H), 7.03 - 7.22 (m, 2 H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 18.3, 28.2, 28.4, 28.7, 29.0, 29.2, 29.3, 29.4, 29.45, 29.5, 33.2, 57.5, 68.0, 84.7, 100.0, 121.3, 150.6, 173.3, 173.8, 191.3; HRMS (ESI) *m/z*: [M-H]⁻ calcd for C₂₁H₃₀NO₃⁻ 344.2220, found 344.2235; [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₃₂NO₃⁺ 346.2377, found 346.2374.

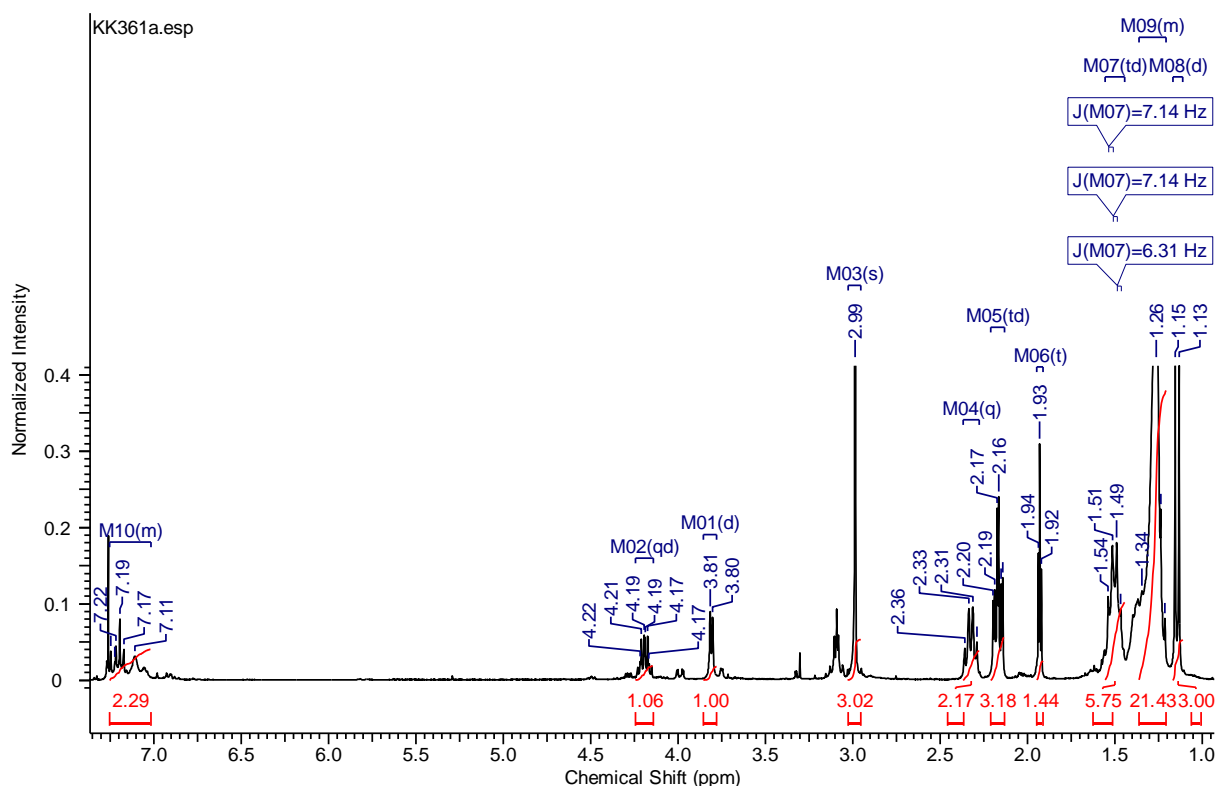


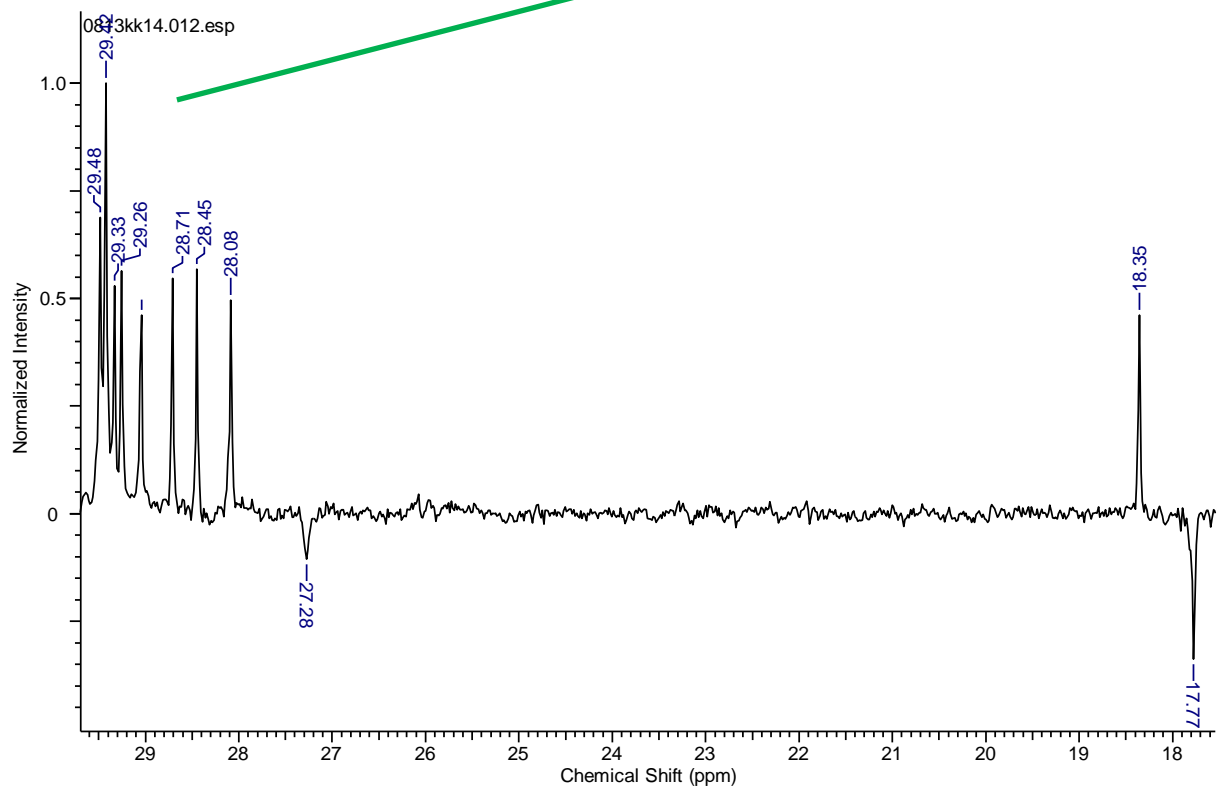
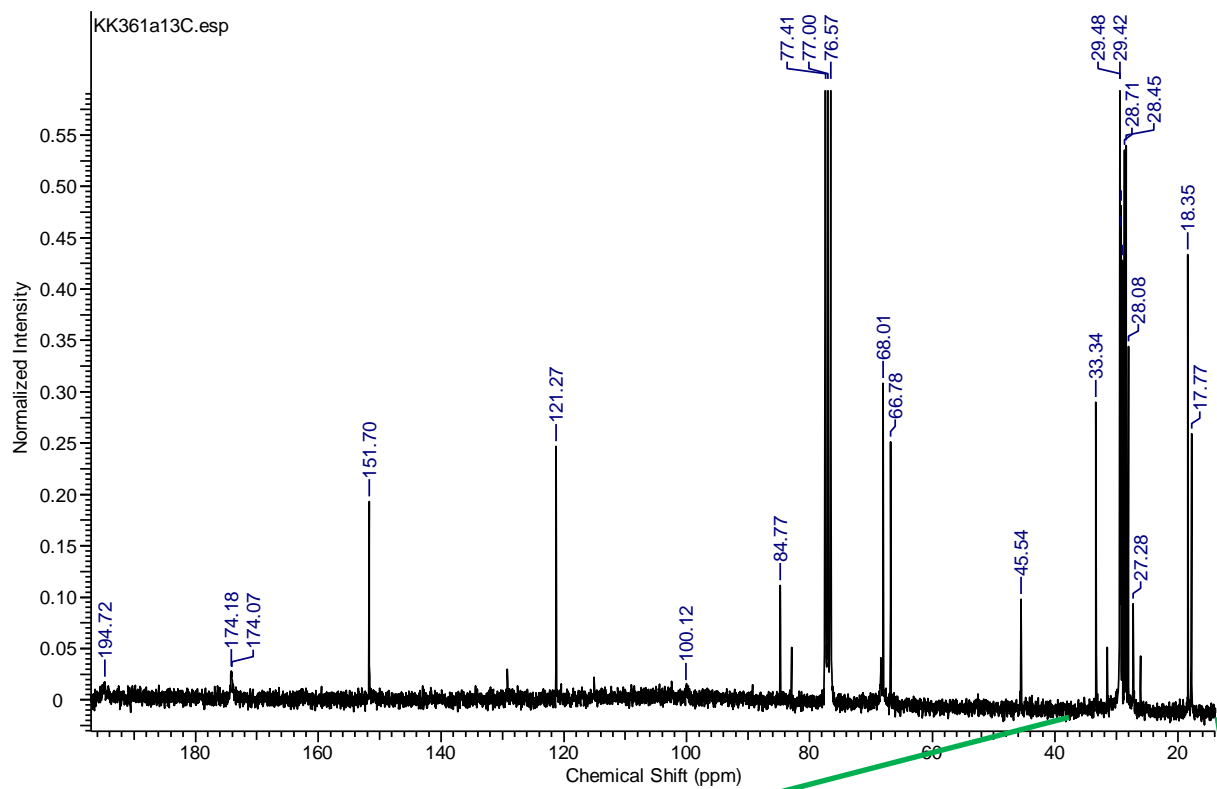
(S)-5-((R)-1-hydroxyethyl)-3-((E)-1-hydroxyhexadec-2-en-15-ynylidene)-1-methylpyrrolidine-2,4-dione 120c



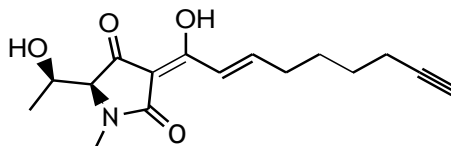
General Procedure 1

IR (ATR) ν_{max} 3409 (br), 3311, 2924, 2854, 1699, 1643, 1583, 1457, 1405, 1375, 1260, 1213, 1089, 987, 942, 809, 620; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 1.14 (d, $J=6.3$ Hz, 3 H), 1.21 - 1.36 (m, 14 H), 1.50 (td, $J=7.1, 6.3$ Hz, 4 H), 1.93 (t, $J=2.6$ Hz, 1 H), 2.17 (td, $J=7.1, 2.6$ Hz, 2 H), 2.32 (q, $J=7.0$ Hz, 2 H), 2.99 (s, 3 H), 3.81 (d, $J=4.4$ Hz, 1 H), 4.19 (qd, $J=6.9, 3.8$ Hz, 1 H), 7.02 - 7.25 (m, 2 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 17.8, 18.4, 27.3, 28.1, 28.5, 28.7, 29.0, 29.26, 29.33, 29.42, 29.44, 29.5, 33.3, 45.5, 66.8, 68.0, 84.8, 100.1, 121.3, 151.7, 174.1, 174.2, 194.7



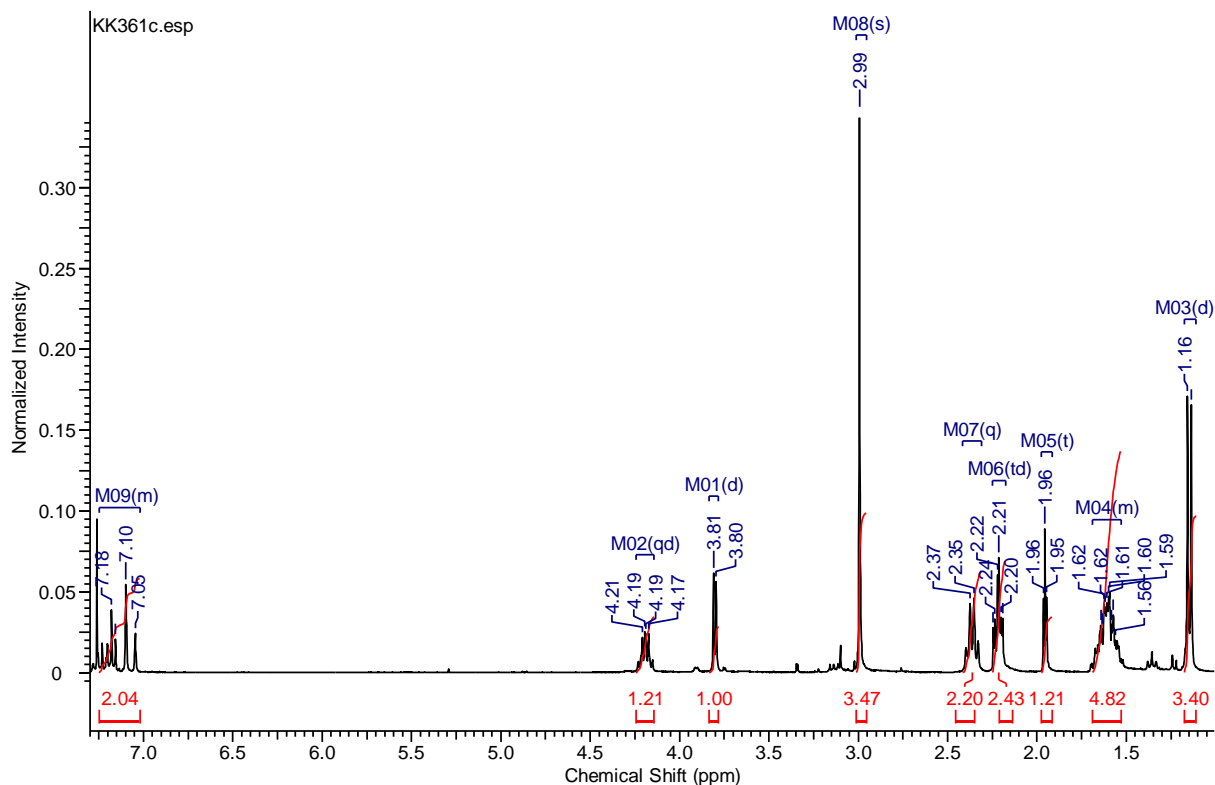


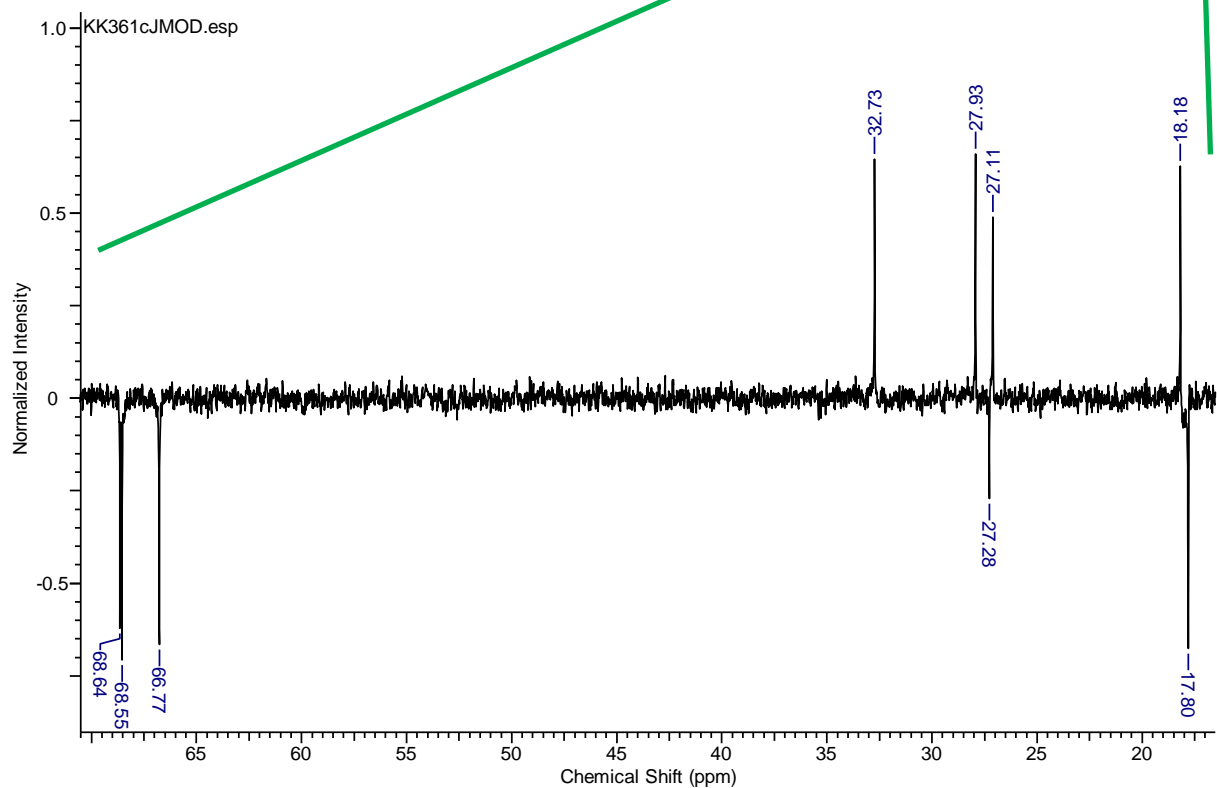
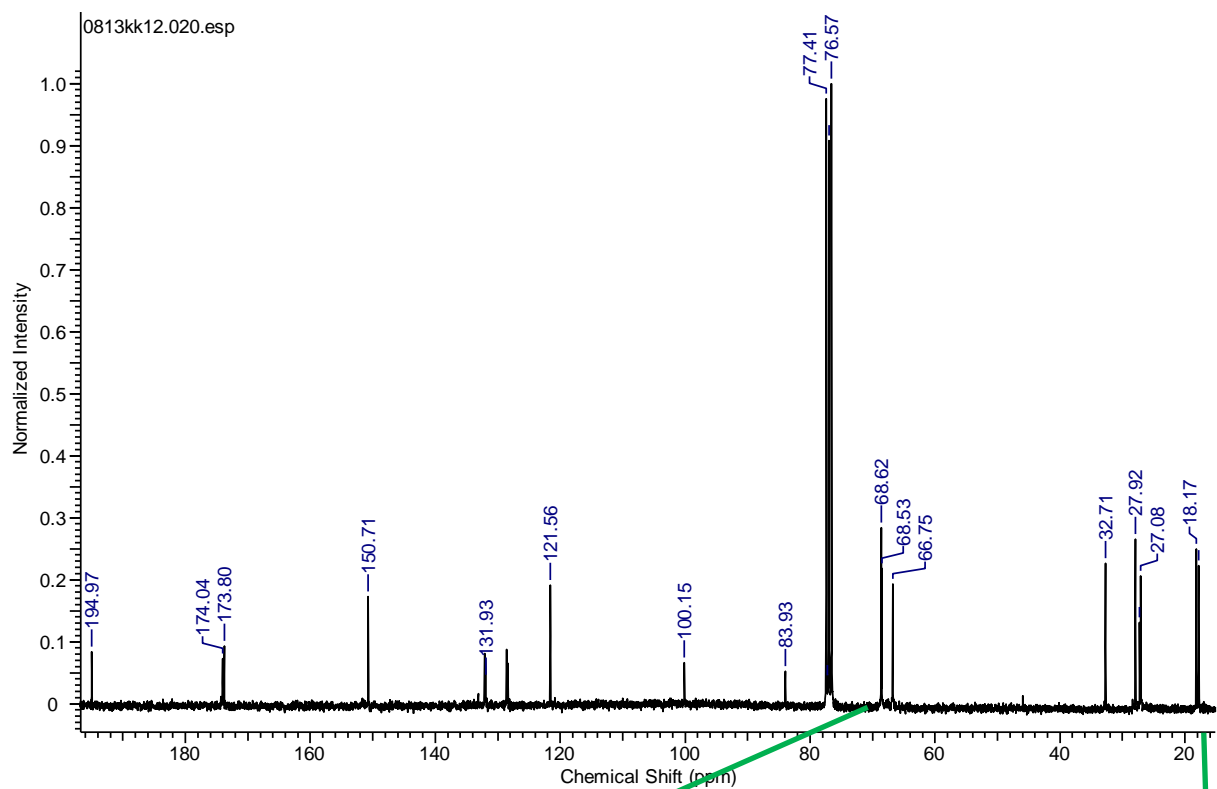
(S)-5-((R)-1-hydroxyethyl)-3-((E)-1-hydroxynona-2-en-8-ynylidene)-1-methylpyrrolidine-2,4-dione 120a



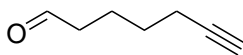
General Procedure 1

IR (ATR) ν_{\max} 3408 (br), 3290, 2969, 2936, 2864, 1696, 1641, 1580, 1480, 1439, 1405, 1375, 1260, 1215, 1120, 1088, 983, 945, 801, 723, 621; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHCl_3 -d) δ ppm 1.15 (d, $J=6.3$ Hz, 3 H), 1.53 - 1.69 (m, 4 H), 1.96 (t, $J=2.6$ Hz, 1 H), 2.22 (td, $J=6.7, 2.6$ Hz, 2 H), 2.36 (q, $J=6.6$ Hz, 2 H), 2.99 (s, 3 H), 3.80 (d, $J=4.4$ Hz, 1 H), 4.19 (qd, $J=6.4, 4.5$ Hz, 1 H), 7.02 - 7.25 (m, 2 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 17.8 (CH_3), 18.2, 27.11, 27.3 (NMe), 27.9, 32.7, 66.8, 68.55, 68.64, 83.9, 100.2, 121.6, 150.7, 173.8, 174.1, 195.0; HRMS (ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{NO}_4^+$ 292.1543, found 292.2632.





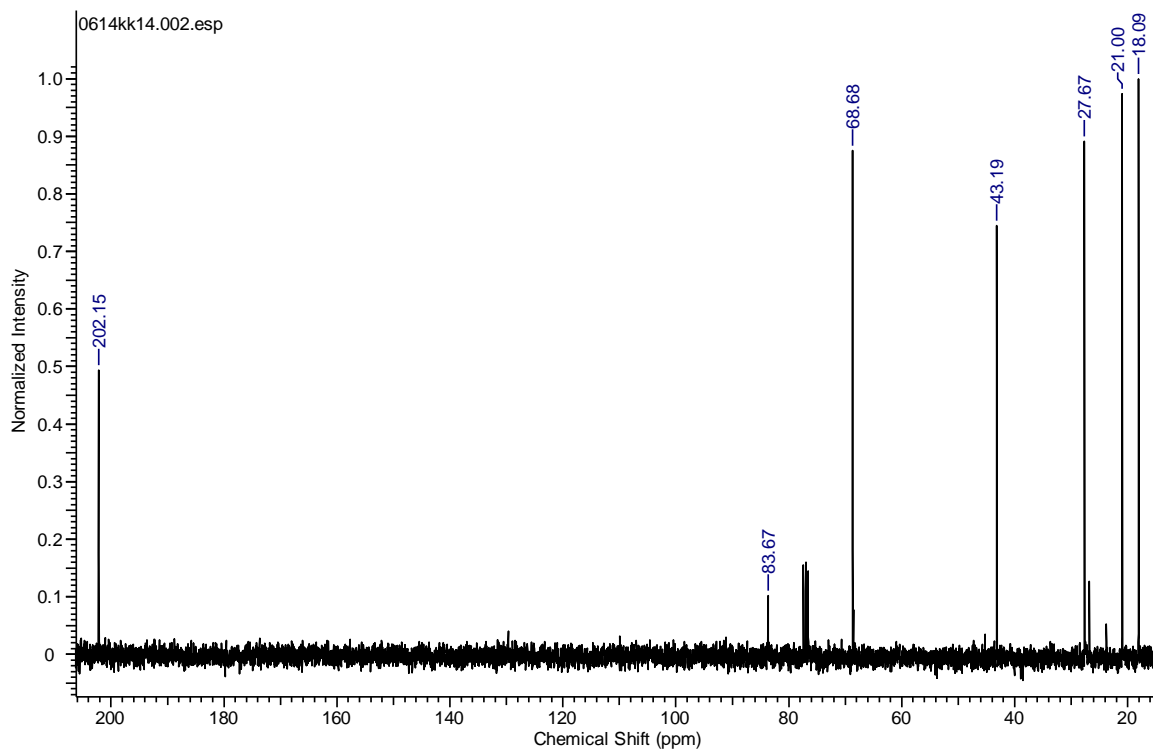
hept-6-ynal 104a⁷⁵

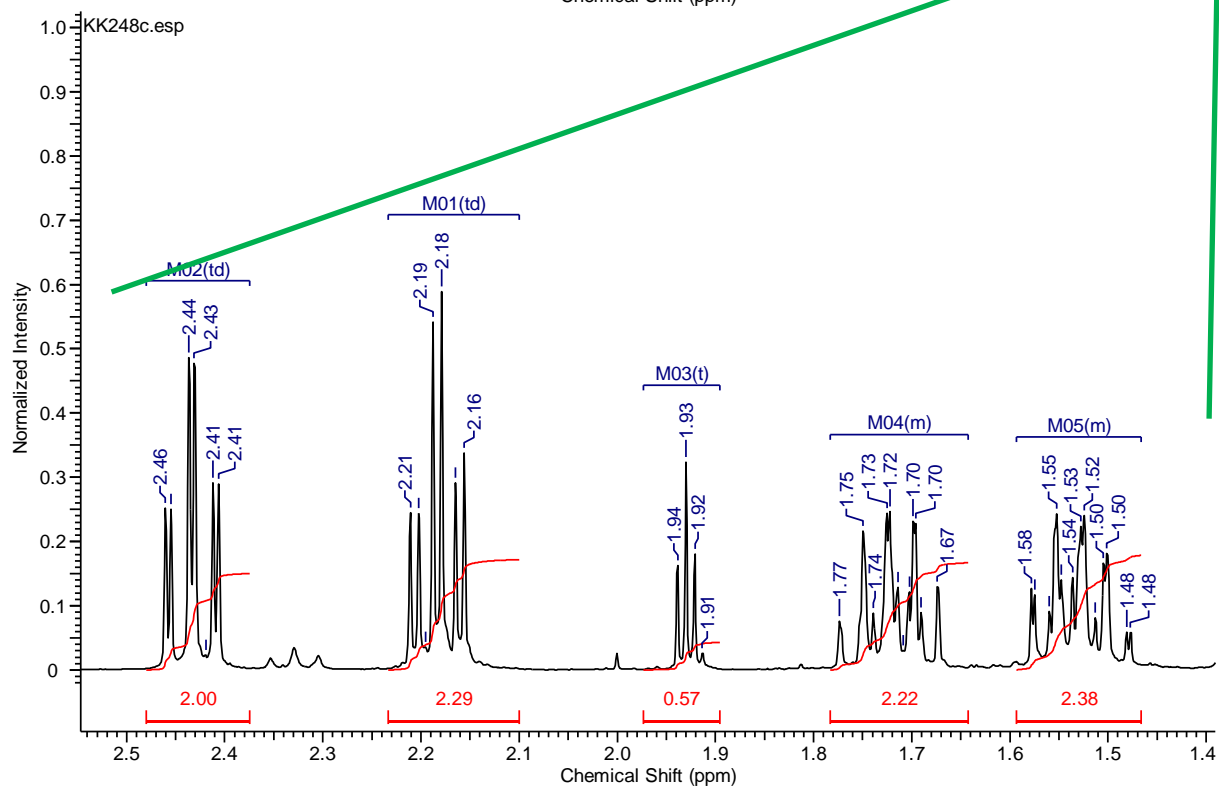
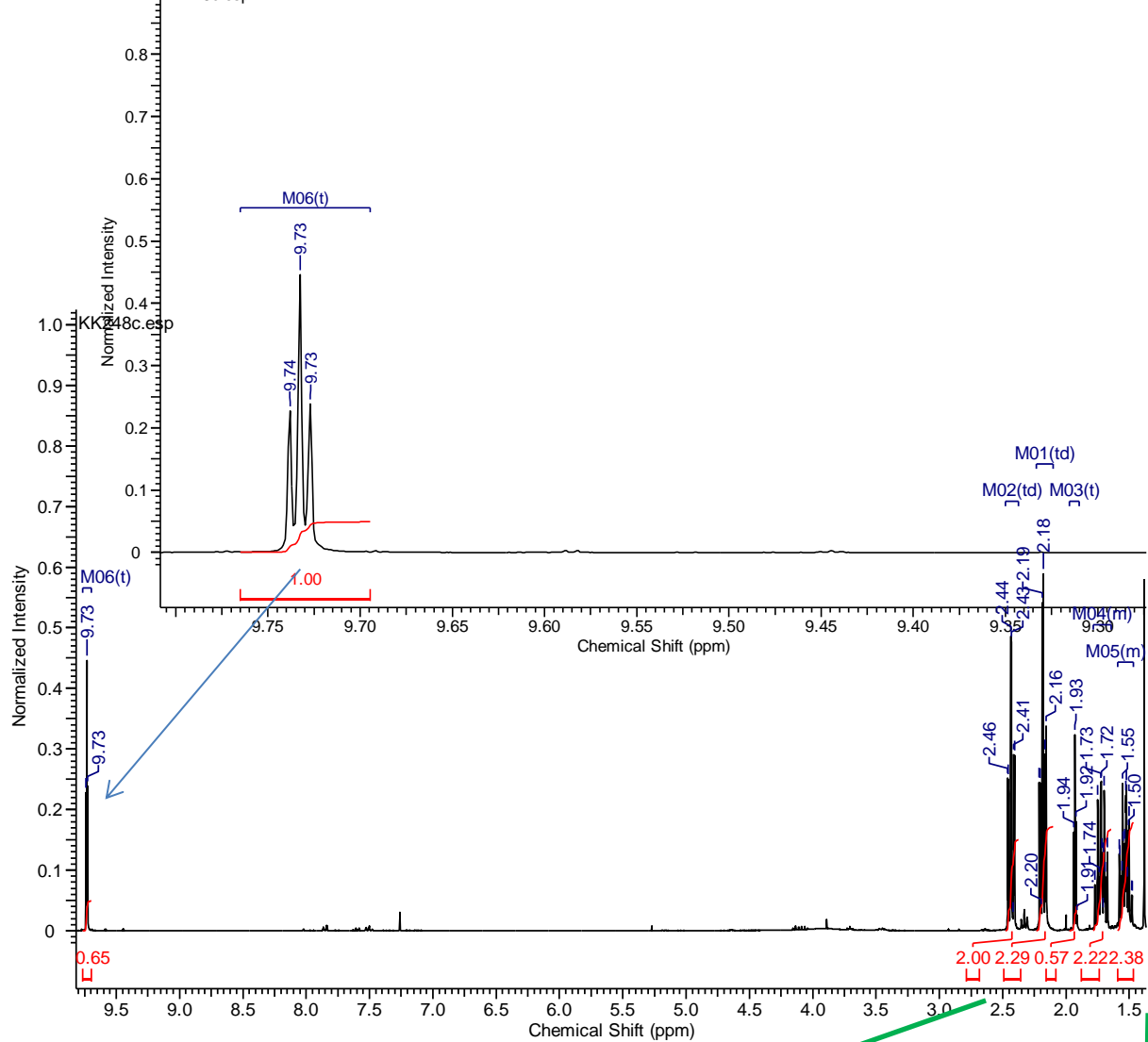


Oxidation of the primary alcohol with 1eq. Dess-Martin- Periodinane according to indicated literature. Column chromatography of the crude product with low-boiling pentane-diethylether. Destillation of the product fractions over Vigreux column without vacuum.

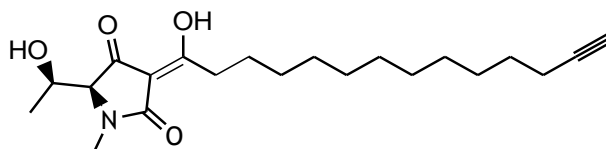
IR (ATR) ν_{\max} 3291, 2935, 2866, 2729, 1721, 1458, 1435, 1409, 1392, 1247, 1078, 874, 632;

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 1.47 - 1.59 (m, 2 H), 1.64 - 1.78 (m, 2 H), 1.93 (t, $J=2.9$ Hz, 1 H), 2.18 (td, $J=6.8, 2.9$ Hz, 2 H), 2.43 (td, $J=7.3, 1.6$ Hz, 2 H), 9.73 (t, $J=1.6$ Hz, 1 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 18.1, 21.0, 27.7, 43.2, 68.7, 83.7, 202.2





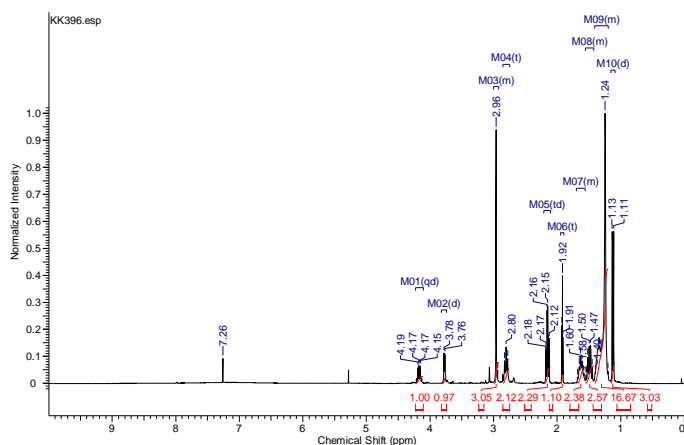
(S)-5-((R)-1-hydroxyethyl)-3-(1-hydroxytetradec-13-ynylidene)-1-methylpyrrolidine-2,4-dione 121

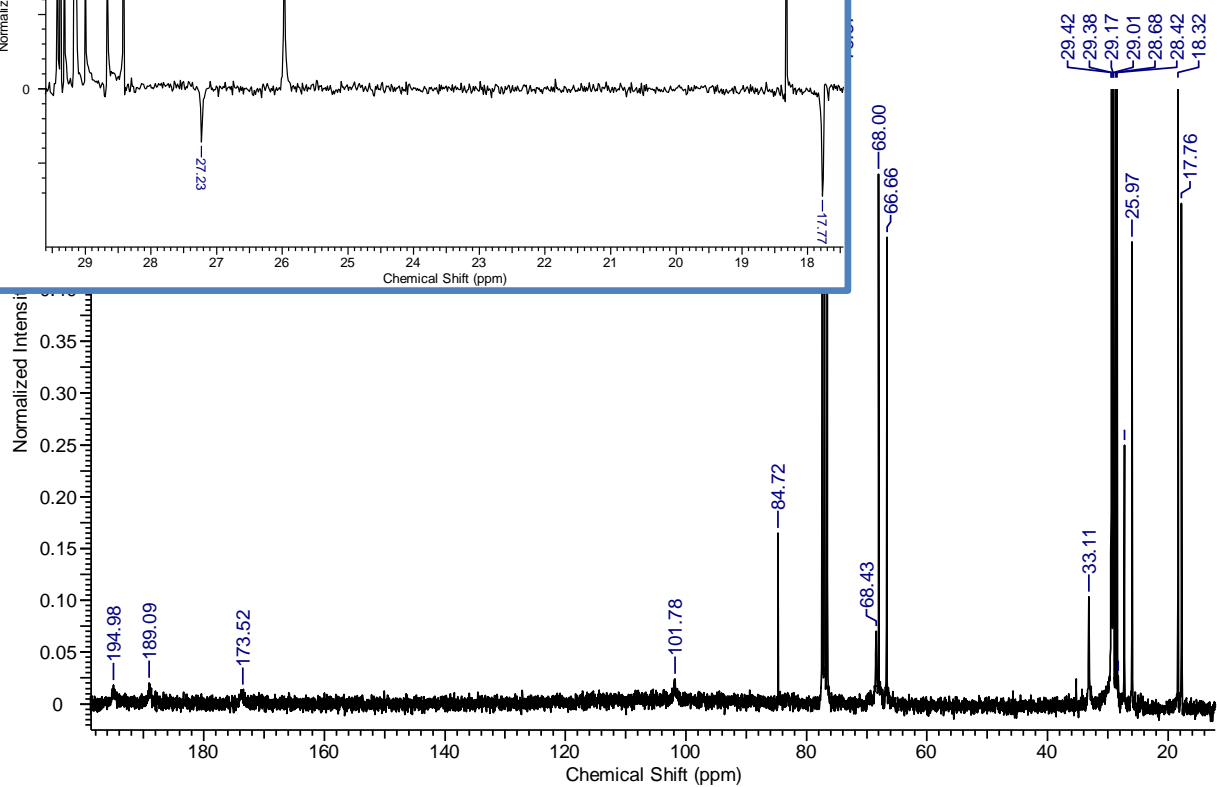
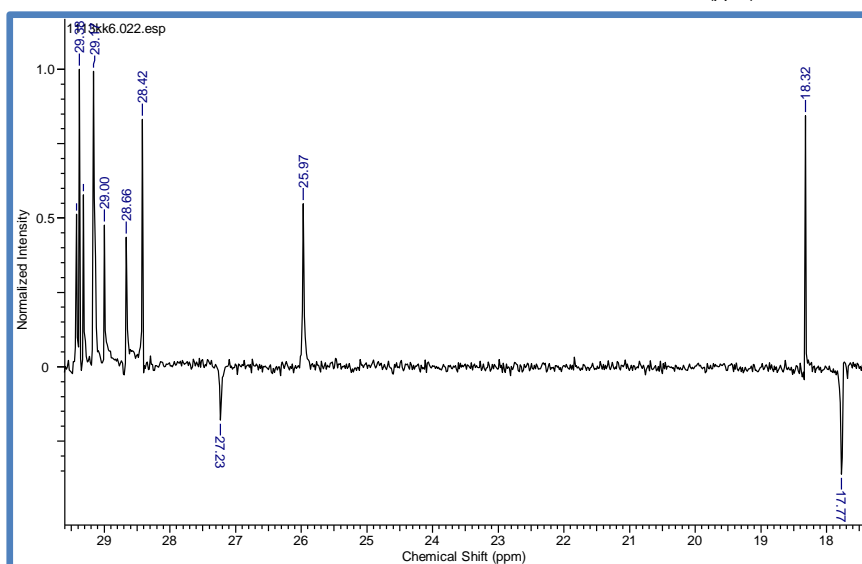
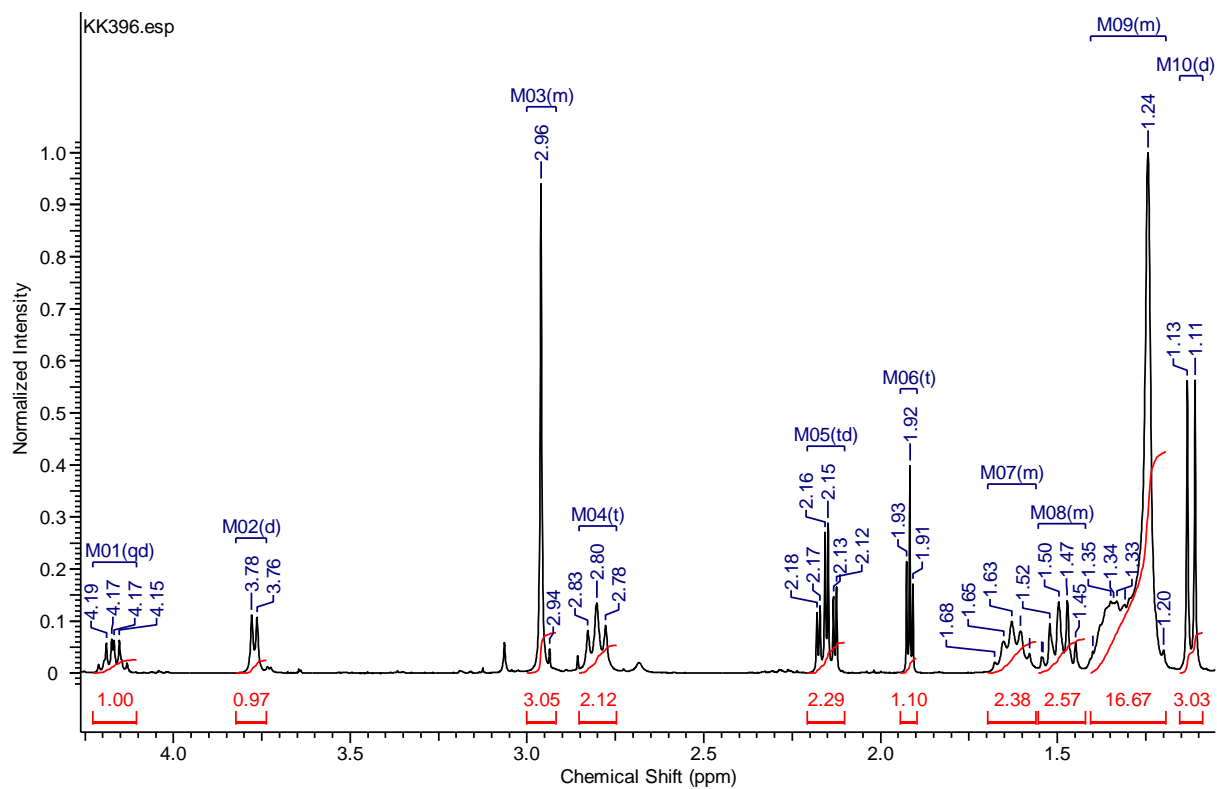


General Procedure 2 for the 4-O- acylation of tetramic acids with subsequent rearrangement³⁹

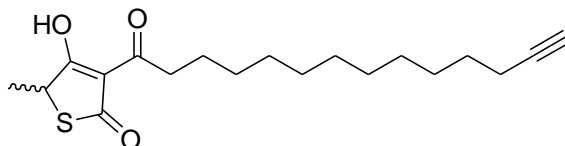
To a solution of acetylenealkanoic acid (1.1 eq.) in CH_2Cl_2 at room temperature were added EDC \times HCl (1.2 eq.), tetramic acid (1.0 eq.), DMAP (0.2 eq.), and the resulting mixture was stirred for 12 h. NEt_3 (1.5 eq.) and dry CaCl_2 (1.5 eq.) were added and stirring was continued for 24 h. After dilution with CH_2Cl_2 the organic phase was washed with 1M NaHSO_4 and 0.05M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ solutions. The aqueous phases were re-extracted with CH_2Cl_2 and the combined organic layers were dried and concentrated in vacuum. The crude product was purified by reversed phase HPLC.

IR (ATR) ν_{max} 3416 (br), 3289, 2926, 2854, 1704, 1646, 1608, 1484, 1456, 1409, 1373, 1345, 1258, 1213, 1123, 1088, 1059, 1036, 976, 943, 809, 732, 624; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.12 (d, $J=6.6$ Hz, 3 H), 1.19 - 1.41 (m, 17 H), 1.42 - 1.55 (m, 3 H), 1.56 - 1.70 (m, 2 H), 1.92 (t, $J=2.6$ Hz, 1 H), 2.15 (td, $J=7.1, 2.6$ Hz, 2 H), 2.80 (t, $J=7.5$ Hz, 2 H), 2.92 - 3.00 (m, 3 H), 3.77 (d, $J=4.7$ Hz, 1 H), 4.17 (qd, $J=6.4, 4.5$ Hz, 1 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 17.8, 18.3, 26.0, 27.2, 28.3, 28.4, 28.7, 29.0, 29.2, 29.3, 29.38, 29.42, 33.1, 66.7, 68.0, 68.4, 84.7, 101.8, 173.5, 189.1, 195.0, MS (EI $^+$): m/z (%) = 363 (7) $[\text{M}]^+$, 319 (100), 301 (16), 276 (8), 220 (6), 208 (8), 199 (21), 180 (32), 168 (43), 155 (61), 140 (71), 113 (33), 95 (10), 81 (14), 55 (28), 42 (39); MS (ESI $^-$): m/z = 362.3 $[\text{M-H}]^-$; HRMS (ESI) m/z : $[\text{M+H}]^+$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{NO}_4^+$ 364.2482, found 364.2478.



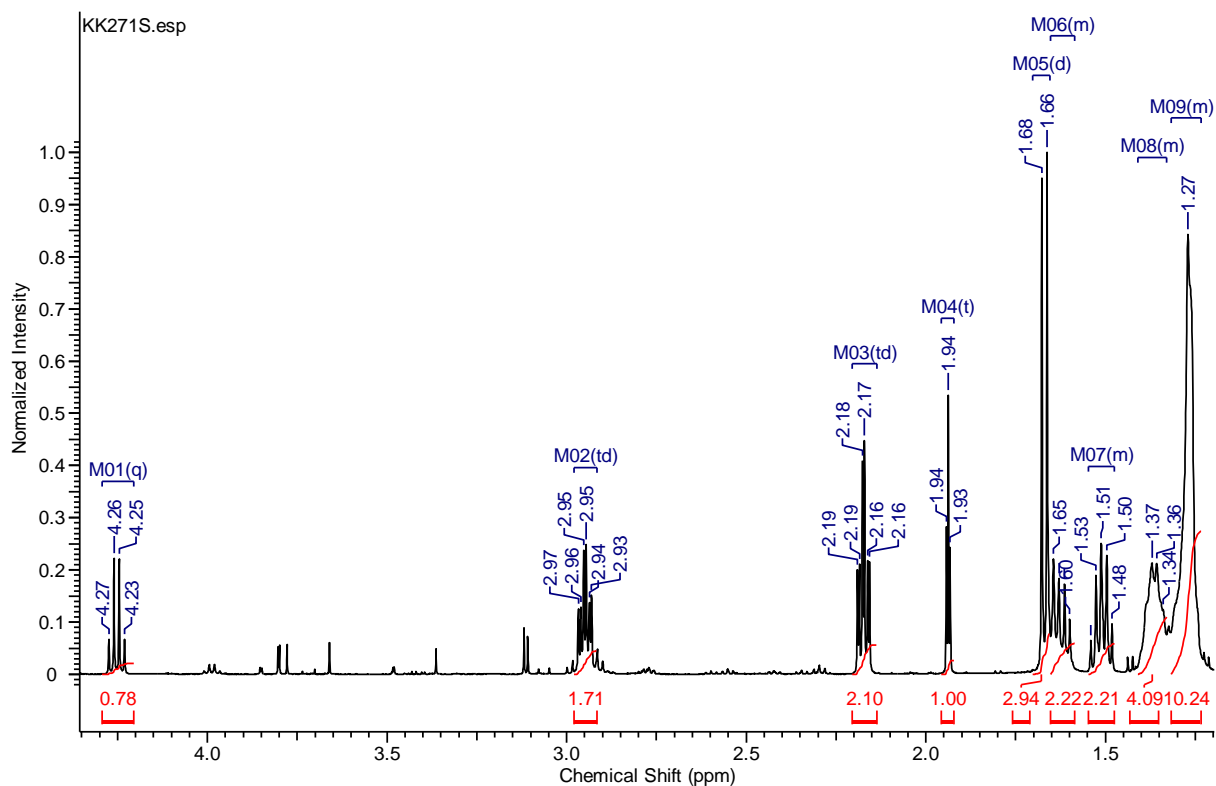


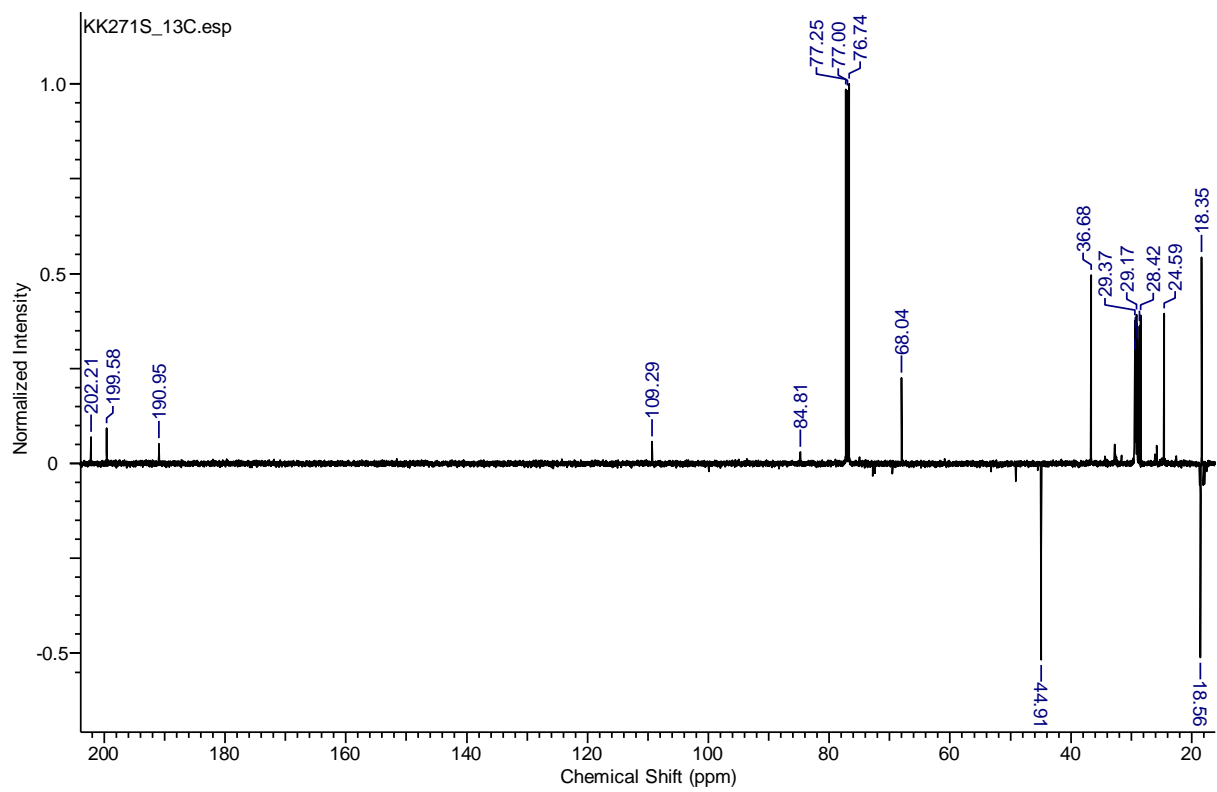
4-hydroxy-5-methyl-3-(tetradec-13-ynoyl)thiophen-2(5H)-one 123

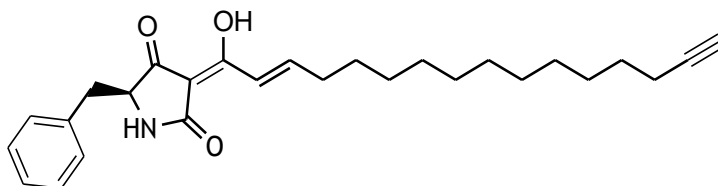


General Procedure 2

IR (ATR) ν_{\max} 3311, 3296, 2925, 2854, 1684, 1612, 1569, 1453, 1431, 1367, 1254, 1197, 1070, 972, 859, 750, 723, 634, 574; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 1.23 - 1.32 (m, 10 H), 1.33 - 1.41 (m, 4 H), 1.48 - 1.55 (m, 2 H), 1.59 - 1.65 (m, 2 H), 1.67 (d, $J=7.2$ Hz, 3 H), 1.94 (t, $J=2.7$ Hz, 1 H), 2.17 (td, $J=7.2, 2.7$ Hz, 2 H), 2.95 (td, $J=7.6, 3.2$ Hz, 2 H), 4.25 (q, $J=7.2$ Hz, 1 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 18.4 (CH_2), 18.6 (CH_3), 24.6, 28.4, 28.7, 29.0, 29.2, 29.3, 29.37, 29.42, 29.5, 36.7, 44.9, 68.0, 84.8, 109.3, 190.9, 199.6, 202.2; MS (ESI-): m/z = 332.3 $[\text{M-H}]^-$; HRMS (ESI) m/z : $[\text{M-H}]^-$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{SO}_3^-$ 335.1686, found 335.1687.

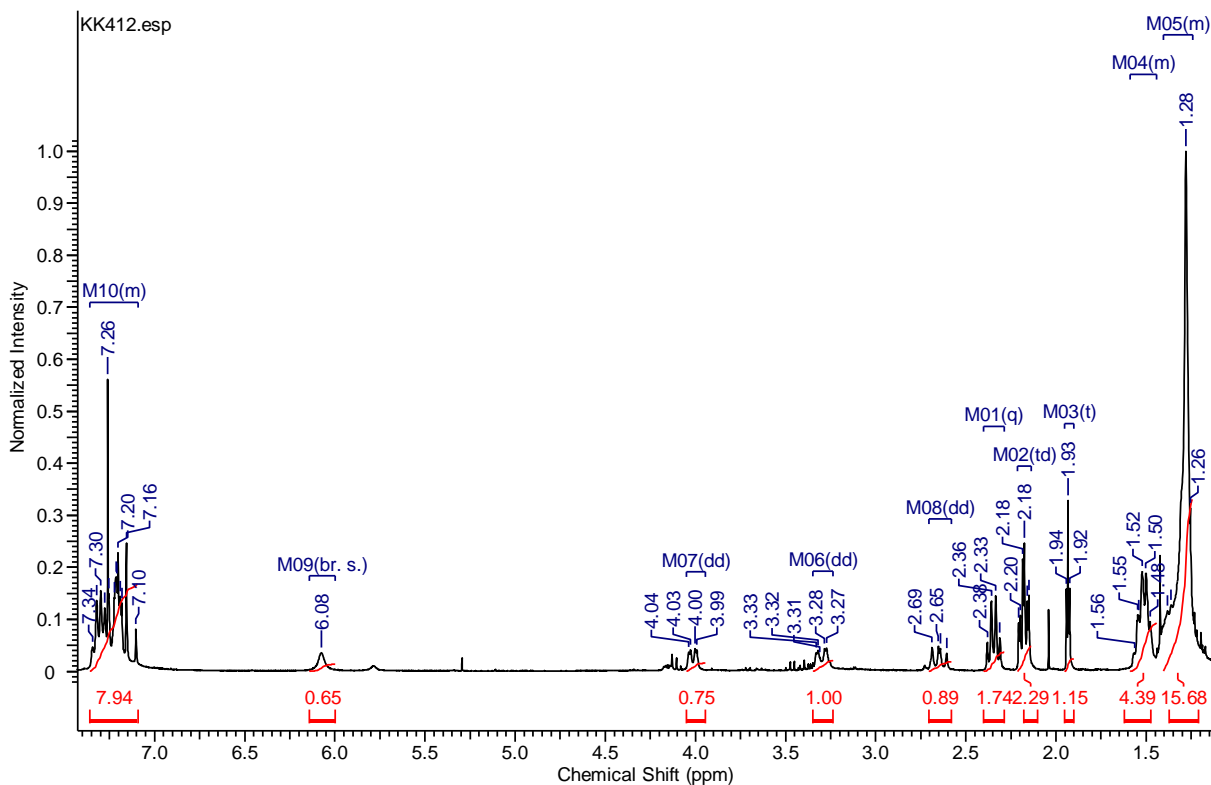


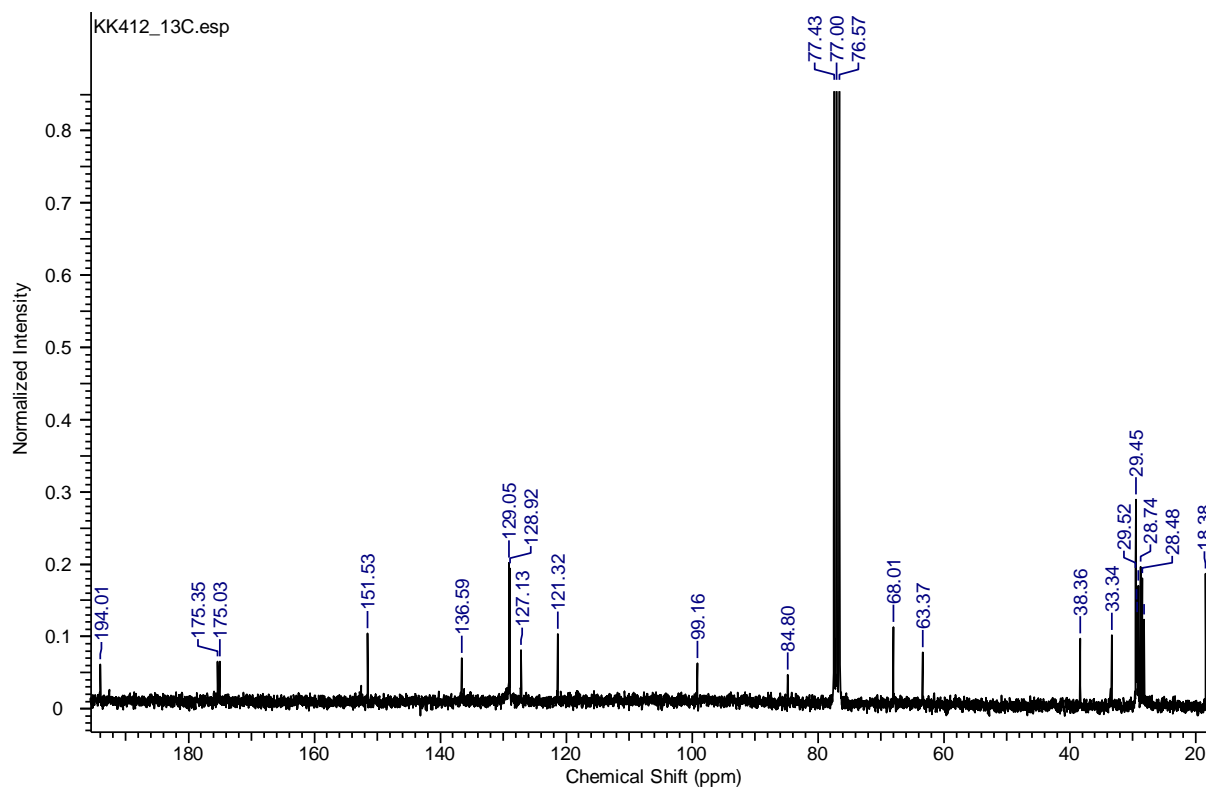




General Procedure 1

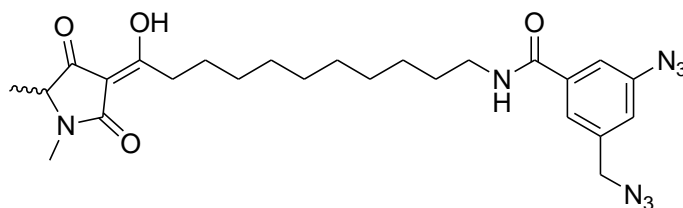
IR (ATR) ν_{max} 3290, 3212 (br), 2922, 2850, 1707, 1651, 1592, 1497, 1467, 1433, 1330, 1282, 1229, 1084, 1030, 987, 958, 883, 789, 721, 696, 660, 643, 574; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.24 - 1.40 (m, 16 H), 1.44 - 1.59 (m, 4 H), 1.93 (t, $J=2.7$ Hz, 1 H), 2.18 (td, $J=7.1$, 2.7 Hz, 2 H), 2.35 (q, $J=6.9$ Hz, 2 H), 2.65 (dd, $J=13.7$, 10.3 Hz, 1 H, CH_2Ph_a), 3.30 (dd, $J=13.7$, 3.0 Hz, 1 H, CH_2Ph_b), 4.01 (dd, $J=10.3$, 3.0 Hz, 1 H, CHN), 6.08 (br. s., 1 H), 7.09 - 7.36 (m, 7 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 18.4, 28.2, 28.5, 28.7, 29.1, 29.3, 29.36, 29.45, 29.45, 29.52, 33.3, 38.4, 63.4, 68.0, 84.8, 99.2, 121.3, 127.1, 128.9, 129.1, 136.6, 151.5, 175.0, 175.4, 194.0; MS (ESI-): $m/z = 420.3$ $[\text{M-H}]^-$





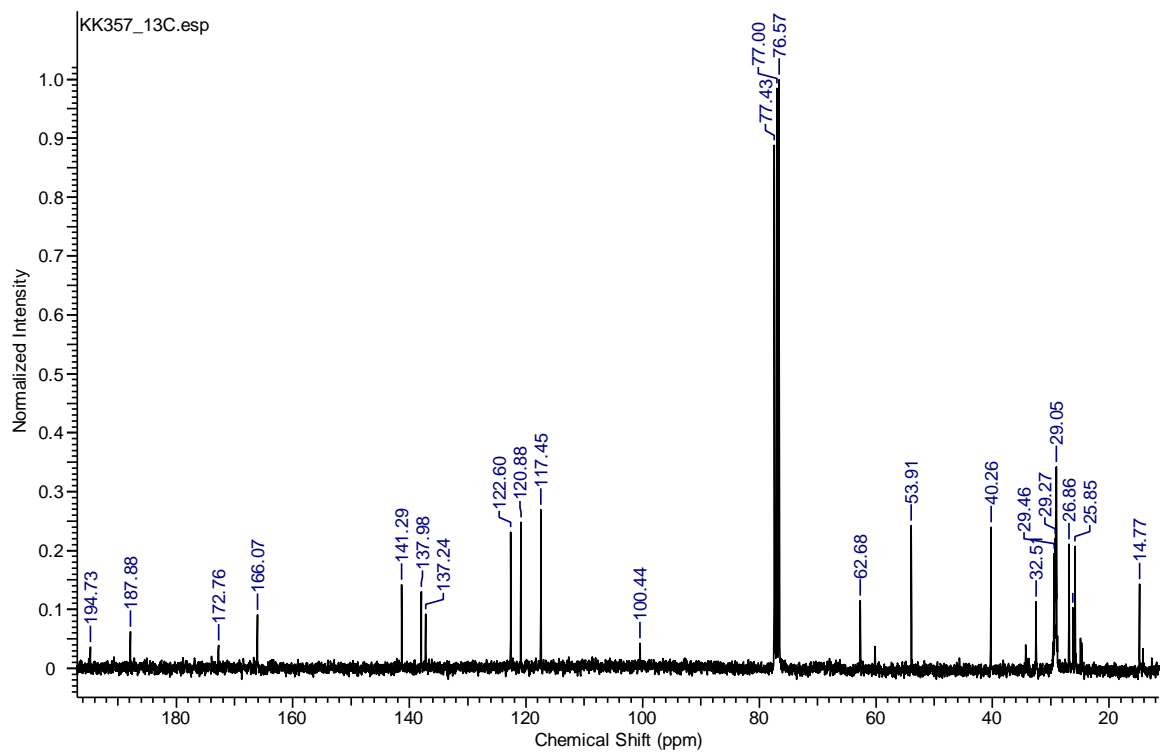
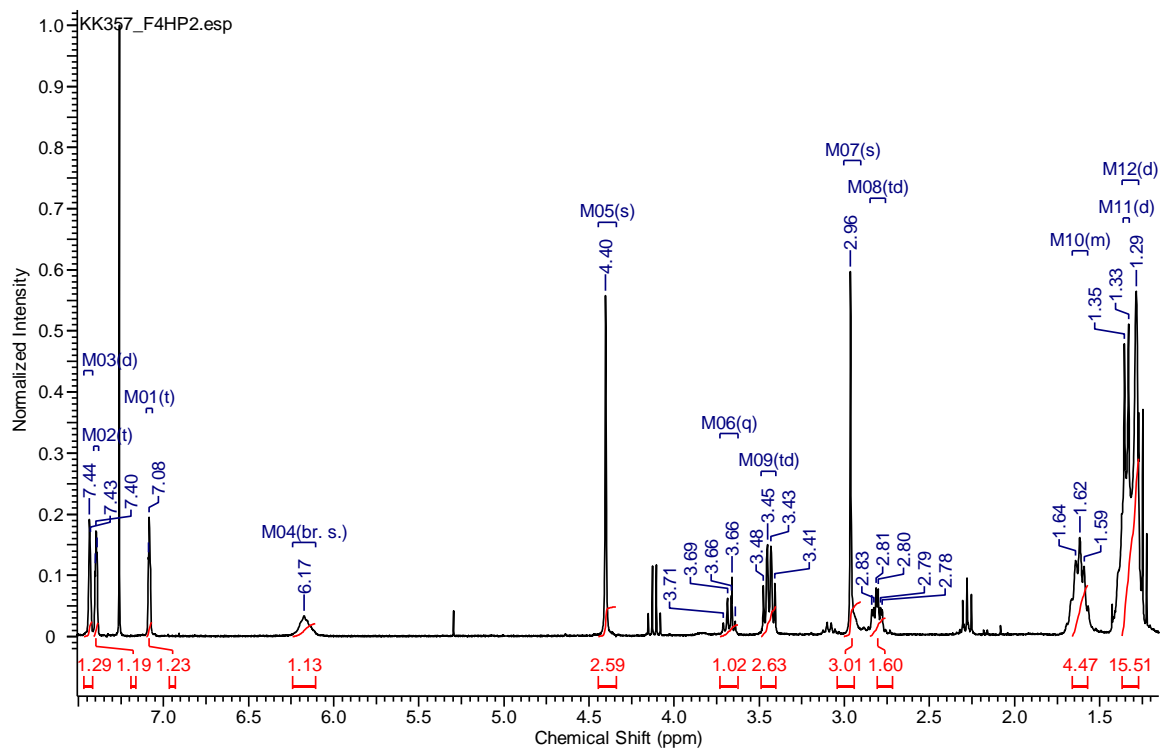
5.2 Bisazide

3-(1'-Hydroxy-11'-(3-azido-5-(azidomethyl)benzamido)undecan-1'-ylidene)-5-methyl-1-methylpyrrolidine-2,4-dione **129**

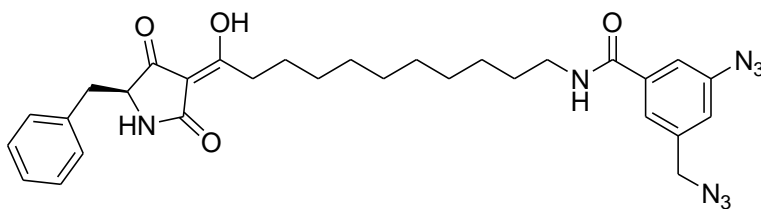


Synthese analog zu **128** (Silylderivat **22** in Abschnitt 4.3, Seite 113)

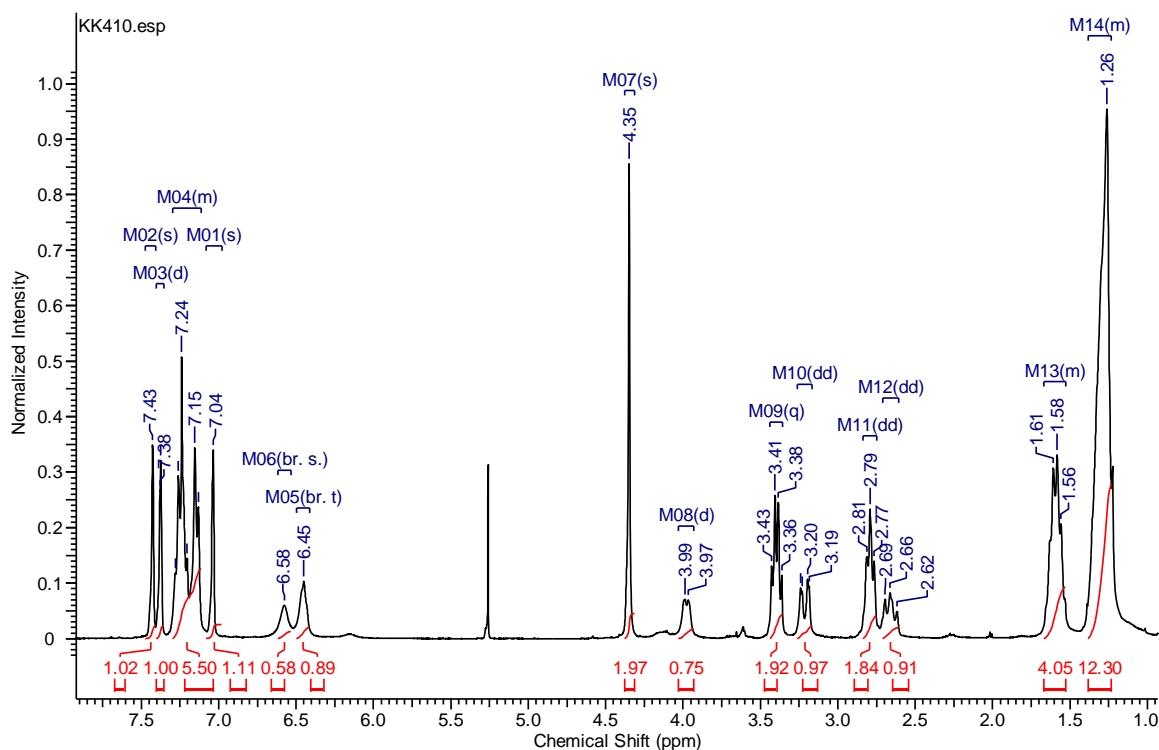
IR (ATR) ν_{max} 3334 (br), 2926, 2855, 2103, 1712, 1639, 1594, 1540, 1446, 1312, 1241, 927, 861, 699; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 1.31 (d, $J=13.4$ Hz, 12 H), 1.34 (d, $J=6.9$ Hz, 3 H), 1.57 - 1.66 (m, 4 H), 2.81 (td, $J=7.5, 2.9$ Hz, 2 H), 2.96 (s, 3 H), 3.44 (td, $J=7.1, 5.8$ Hz, 2 H), 3.68 (q, $J=6.9$ Hz, 1 H), 4.40 (s, 2 H), 6.17 (br. s., 1 H), 7.08 (t, $J=1.6$ Hz, 1 H), 7.40 (t, $J=1.6$ Hz, 1 H), 7.43 (d, $J=1.6$ Hz, 1 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 14.8, 25.9, 26.2, 26.9, 29.05, 29.05, 29.13, 29.13, 29.3, 29.5, 32.5, 40.3, 53.9, 62.7, 100.4, 117.5, 120.9, 122.6, 137.2, 138.0, 141.3, 166.1, 172.8, 187.9, 194.7

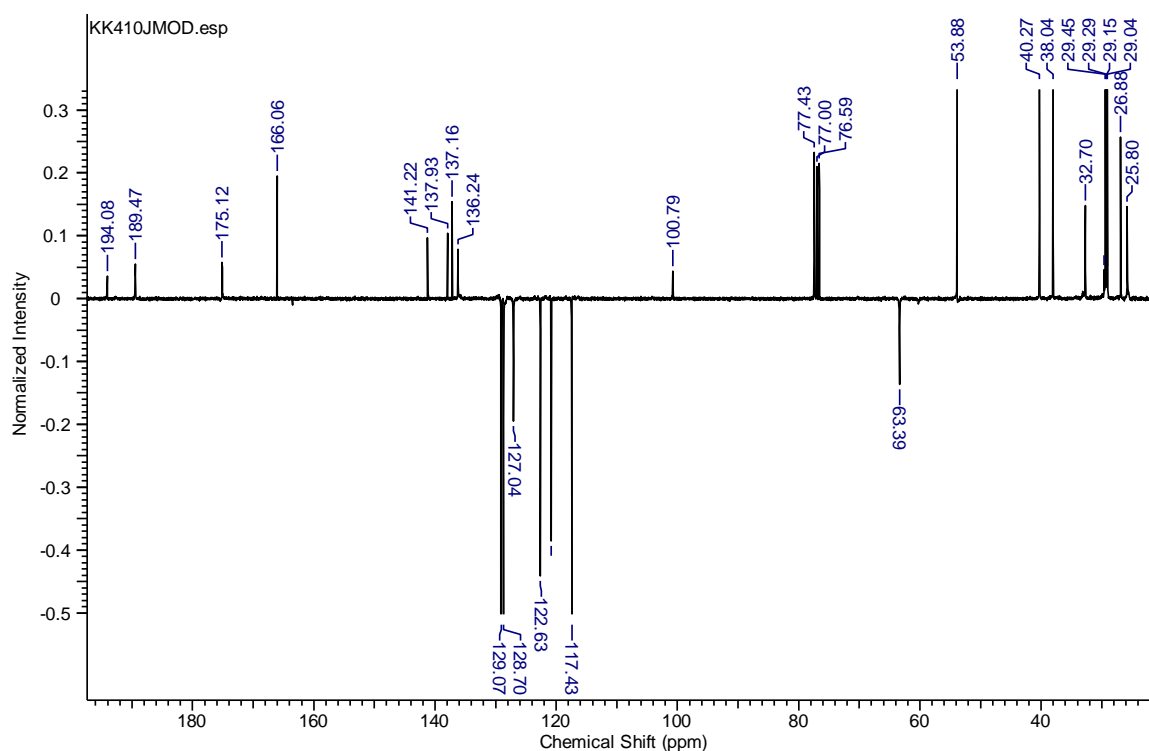


3-(1'-Hydroxy-11'-(3-azido-5-(azidomethyl)benzamido)undecan-1'-ylidene)-5-phenylmethyl-1-methylpyrrolidine-2,4-dione 130



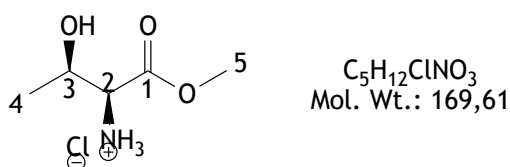
IR (ATR) ν_{max} 3280 (br), 2927, 2854, 2106, 1705, 1651, 1602, 1543, 1454, 1443, 1345, 1314, 1278, 1213, 1083, 1026, 859, 699; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 1.23 - 1.38 (m, 12 H), 1.53 - 1.67 (m, 4 H), 2.66 (dd, $J=13.7$, 8.5 Hz, 1 H), 2.79 (dd, $J=8.5$, 6.9 Hz, 2 H), 3.21 (dd, $J=13.7$, 3.0 Hz, 1 H), 3.40 (q, $J=6.9$ Hz, 2 H), 3.98 (d, $J=6.9$ Hz, 1 H), 4.35 (s, 2 H), 6.45 (br. t, $J=5.5$ Hz, 1 H, CH_2NH), 6.58 (br. s., 1 H, CHNH), 7.04 (s, 1 H), 7.11 - 7.30 (m, 5 H), 7.38 (d, $J=1.4$ Hz, 1 H), 7.43 (s, 1 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 25.8, 26.9, 29.0, 29.0, 29.1, 29.3, 29.5, 29.6, 32.7, 38.0, 40.3, 53.9, 63.4, 100.8, 117.4, 120.8, 122.6, 127.0, 128.7, 128.7, 129.1, 129.1, 136.2, 137.2, 137.9, 141.2, 166.1, 175.1, 189.5, 194.1





5.3 Aminoester und nicht markierte Penicillenolderivate

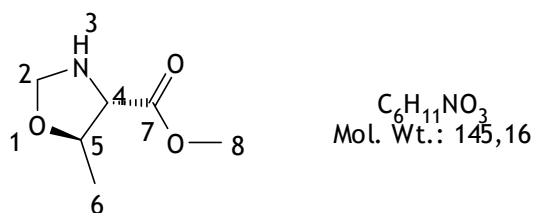
L-Threonin-methylester-hydrochlorid **173**⁷⁶



Unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss werden 10.9 mL (150 mmol) Thionylchlorid bei 0 °C tropfenweise in 50 mL abs. Methanol gegeben und dann weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend werden 5.9 g (50 mmol) L-Threonin **172** zugegeben und die Lösung 24 h bei RT gerührt. Nach evaporieren der flüchtigen Komponenten gewinnt man **173** (8.4 g, 50 mmol, 100 %) als farblosen Feststoff. Das Rohprodukt wird ohne Reinigung weiterverwendet.

^1H -NMR (300 MHz, TMS_{int} , CDCl_3): δ (ppm) = 1.47 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 3H, CHCH_3 , H-4), 3.84 (s, 3H, OCH_3 , H-5), 4.11 (m, 1H, CHNH_3 , H-2), 4.34 (qn, $^3J = 6.5$ Hz, 1H, CHCH_3 , H-3), 8.39 (s, br, 3H, N^+H_3); ^{13}C -NMR (75.5 MHz, TMS_{int} , Methanol- d_4): δ (ppm) = 18.7 (CHCH_3 , C-4), 53.7 (OCH_3 , C-5), 58.4 (CHN , C-2), 65.2 (CHCH_3 , C-3), 169.2 (COOMe , C-1).

(4S,5R)-Methyl-5-methyloxazolidin-4-carboxylat **175**⁵⁷

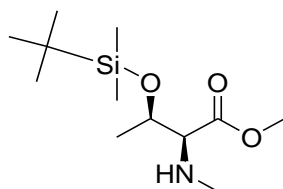


Zu einer Lösung von **173** (8.4 g, 50 mmol) in 500 mL (50 mmol) 0.1 M wäßr. TFA werden 400 mL DCM gegeben und die Mischung auf 0 °C gekühlt. Dann werden unter starkem Rühren 4 mL (50 mmol) 37 %ige Formalinlösung zugetropft und die Mischung weitere 3 h bei RT gerührt. Danach wird die Wasserphase mit ges. $KHCO_3$ -Lösung neutralisiert und nach Phasentrennung viermal mit DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingengt. Man erhält **175** (5.39 g, 37.2 mmol, 74 %) als farbloses Öl. Das Rohprodukt wird ohne Reinigung weiterverwendet.

1H -NMR (300 MHz, TMS_{int} , $CDCl_3$): δ (ppm) = 1.34 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 3H, $CHCH_3$, H-6), 2.61 (s, br, 1H, NH, H-3), 3.41 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 1H, CHN, H-4), 3.75 (s, 3H, OCH_3 , H-8), 3.84 (qn, $^3J = 6.1$ Hz, $CHCH_3$, H-5), 4.46 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, OCH_2N , H-2), 4.55 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, OCH_2N , H-2); ^{13}C -NMR (75.5 MHz, TMS_{int} , $CDCl_3$): δ (ppm) = 19.7 ($CHCH_3$, C-6), 51.2 (OCH_3 , C-8), 69.4 (CHN, C-4), 75.0 ($CHCH_3$, C-5), 84.5 (OCH_2N , C-2), 171.7 ($COOMe$, C-7).

N-Methyl- O-TBDMS -L-threonin-methylester **250**

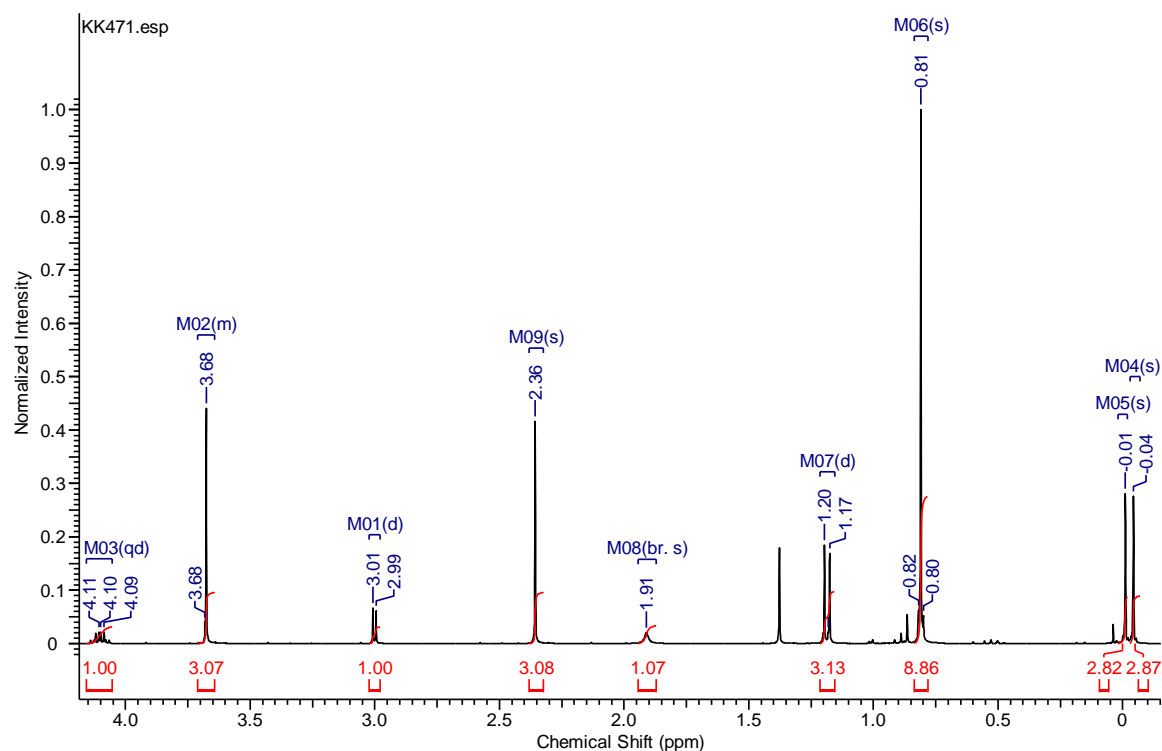
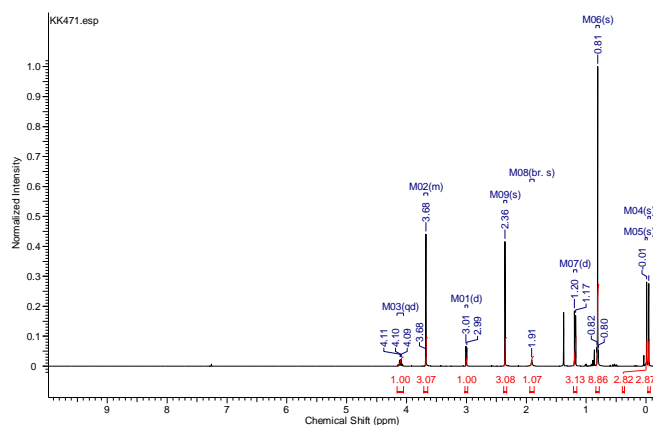
(2S,3R)-methyl 3-(tertbutyl-dimethyl-silyl)-oxy-2-(methylamino)-butanoat

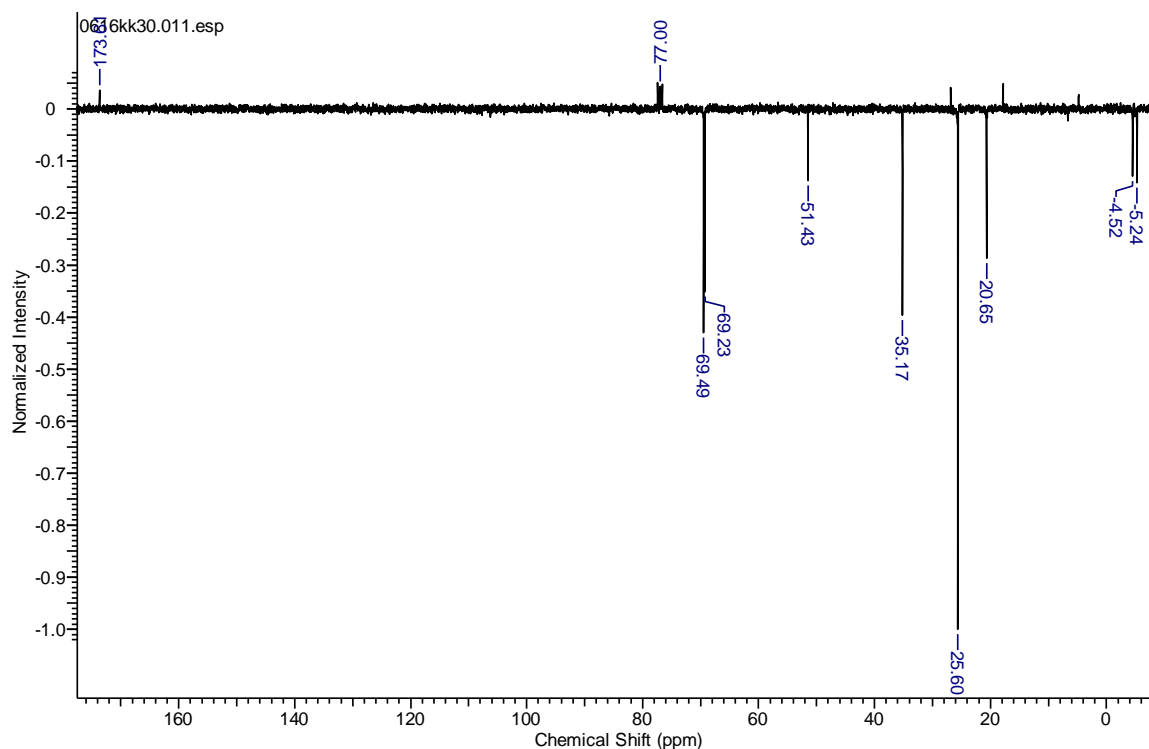


Unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wird **175** (1.91 g, 13.1 mmol) in abs. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden 65 mL TFA und 3.5 mL (2.5 g, 22 mmol) Triethylsilan zugegeben⁵⁷. Die Lösung wird 20 h bei RT gerührt und anschließend bei 0 °C mit ges. $KHCO_3$ -Lösung basifiziert. Dann werden die Phasen getrennt und die wässrige viermal mit DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingengt. Das Rohprodukt **176** wird mittels Filtration über Silicagel von den Silylnebenprodukten befreit. **176** (1.3 g, 8.8 mmol) wird dann in abs. DCM gelöst und mit

0.54 g Imidazol (8 mmol, wobei ich aus Versehen einen leichten Unter- statt Überschuss einsetzte; dies ist eben im Gegensatz zu meinen anderen Synthesen keine mehrfach optimierte Route) und 1.2 g TBS-Cl (8 mmol) zur Reaktion gebracht. Die Mischung wird 20 h bei RT gerührt und danach mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wird noch zweimal mit DCM extrahiert, die vereinigten org. Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingeeengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. Man erhält **250** (1.22 g, 4.7 mmol, 36 % nach zwei Stufen, nicht optimiert) als farbloses Öl.

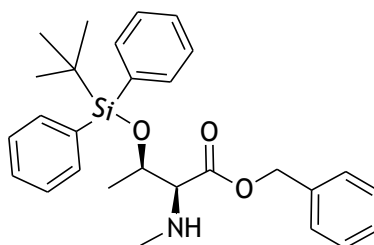
IR (ATR) ν_{max} 2951, 2932, 2889, 2858, 2802, 1747, 1463, 1373, 1316, 1252, 1168, 1146, 1097, 1058, 1004, 953, 892, 827, 810, 774, 666, ¹H-NMR (300 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm -0.04 (s, 3 H), -0.01 (s, 3 H), 0.81 (s, 9 H), 1.18 (d, J=6.3 Hz, 3 H), 1.91 (br. s, 1 H), 2.36 (s, 3 H), 3.00 (d, J=3.8 Hz, 1 H), 3.64 - 3.71 (m, 3 H), 4.10 (qd, J=6.3, 3.8 Hz, 1 H); ¹³C-NMR (75 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm -5.2, -4.5, 20.7, 25.6, 35.2, 51.4, 69.2, 69.5, 173.6





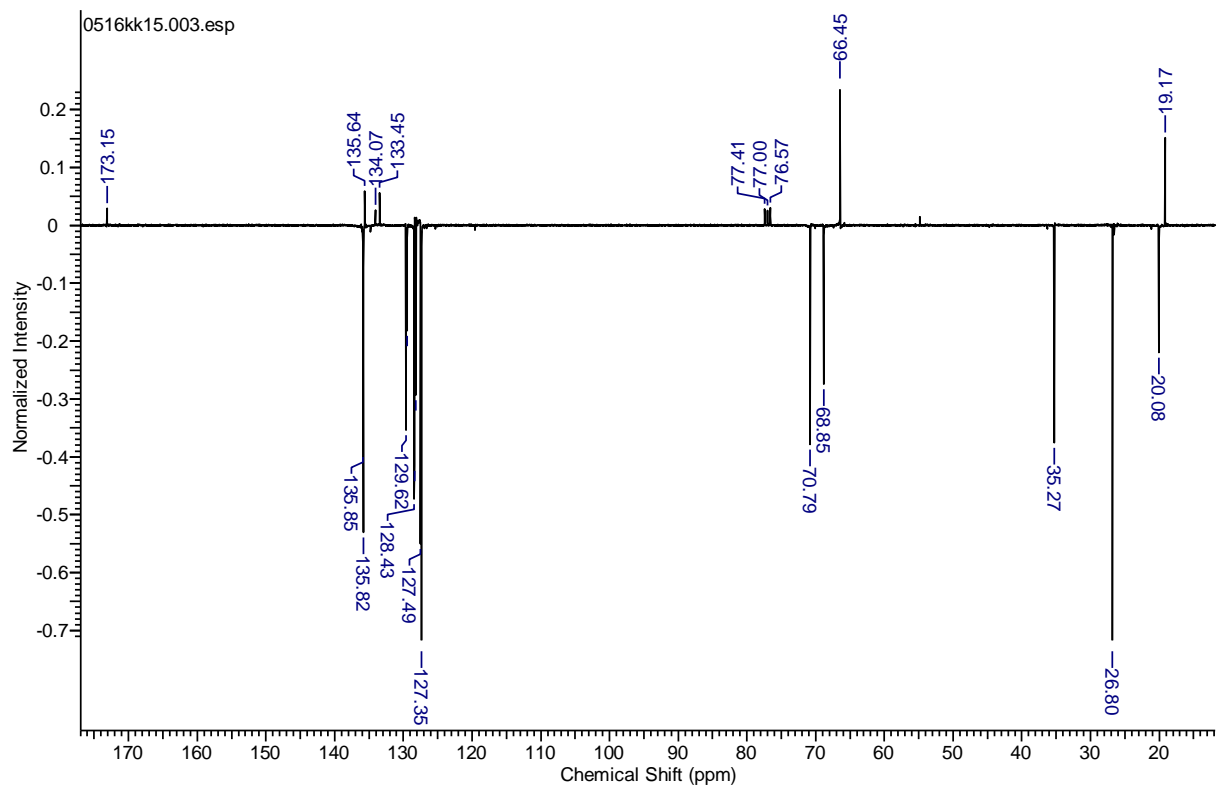
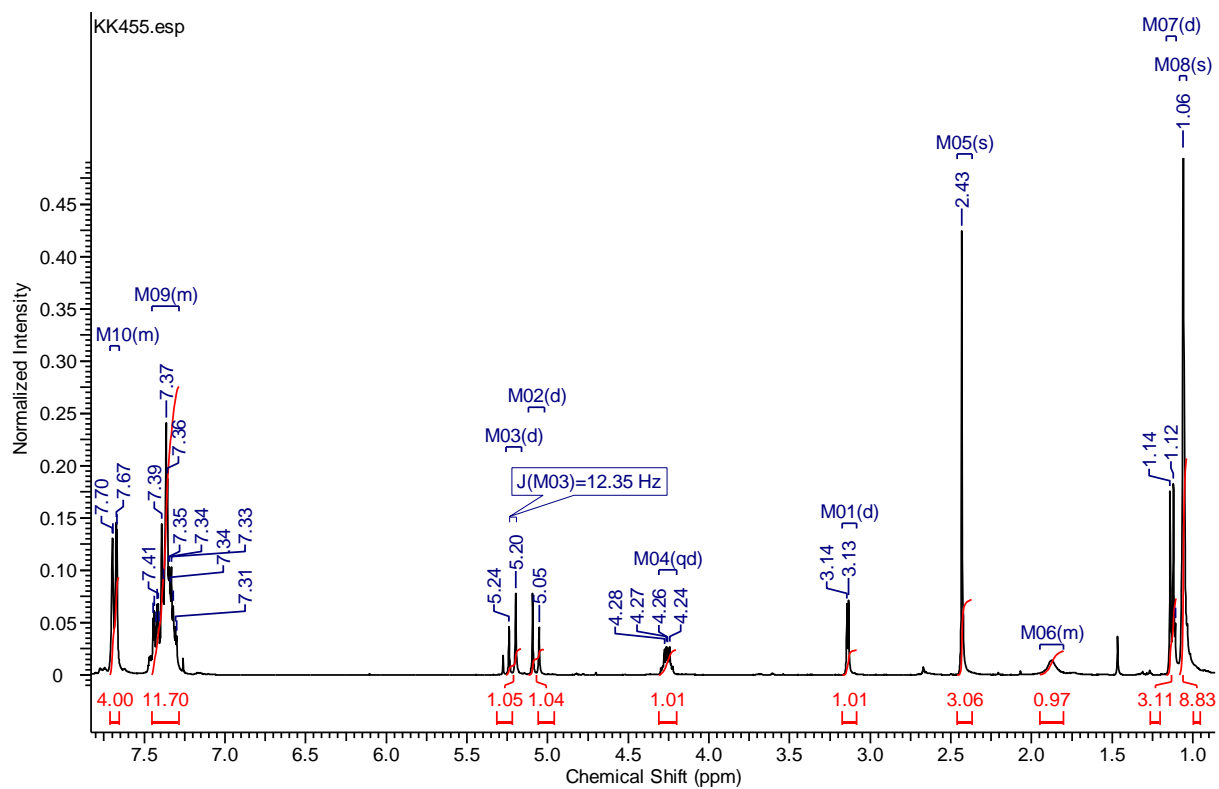
N-Methyl- O-TBDPS -L-threonin-benzylester 258

(2S,3R)-benzyl 3-(*tert*butyl-diphenyl⁷⁷-silyl)-oxy-2-(methylamino)-butanoat

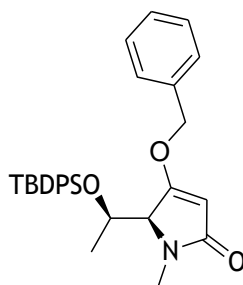


Die komplette Route zum TBDPS- Allomethioisetin erfolgte über dieselben Methoden analog zu den Synthesen zum TIPS- Allomethioisetin (Anhang Manuskript 3), ausgehend von TBDPS-Trifluoromethansulfonat.

IR (ATR) ν_{\max} 2932, 2858, 1738, 1473, 1455, 1427, 1374, 1164, 1111, 1094, 1057, 997, 949, 822, 736, 698, 609; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 1.06 (s, 9 H), 1.13 (d, $J=6.3$ Hz, 3 H), 1.88 (br. s, 1 H), 2.43 (s, 3 H), 3.14 (d, $J=3.4$ Hz, 1 H), 4.26 (qd, $J=6.3, 3.4$ Hz, 1 H), 5.07 (d, $J=12.4$ Hz, 1 H), 5.22 (d, $J=12.3$ Hz, 1 H), 7.28 - 7.44 (m, 11 H), 7.66 - 7.71 (m, 4 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 19.2, 20.1, 26.8, 35.3, 66.4, 68.9, 70.8, 127.4, 127.5, 128.2, 128.4, 128.4, 129.5, 129.6, 133.4, 134.1, 135.6, 135.8, 135.9, 173.2; HRMS (ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ für $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{NO}_4\text{Si}^+$ berechnet: 462.2459, gefunden: 462.2437.

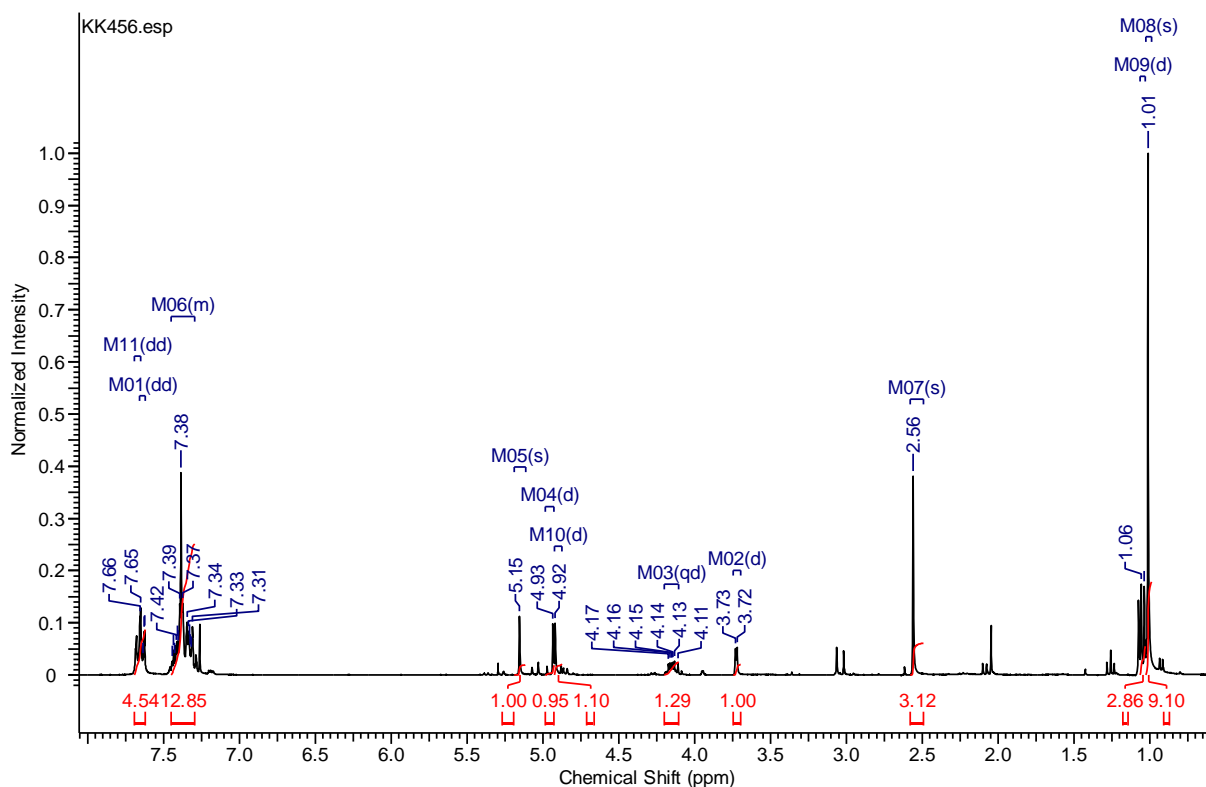


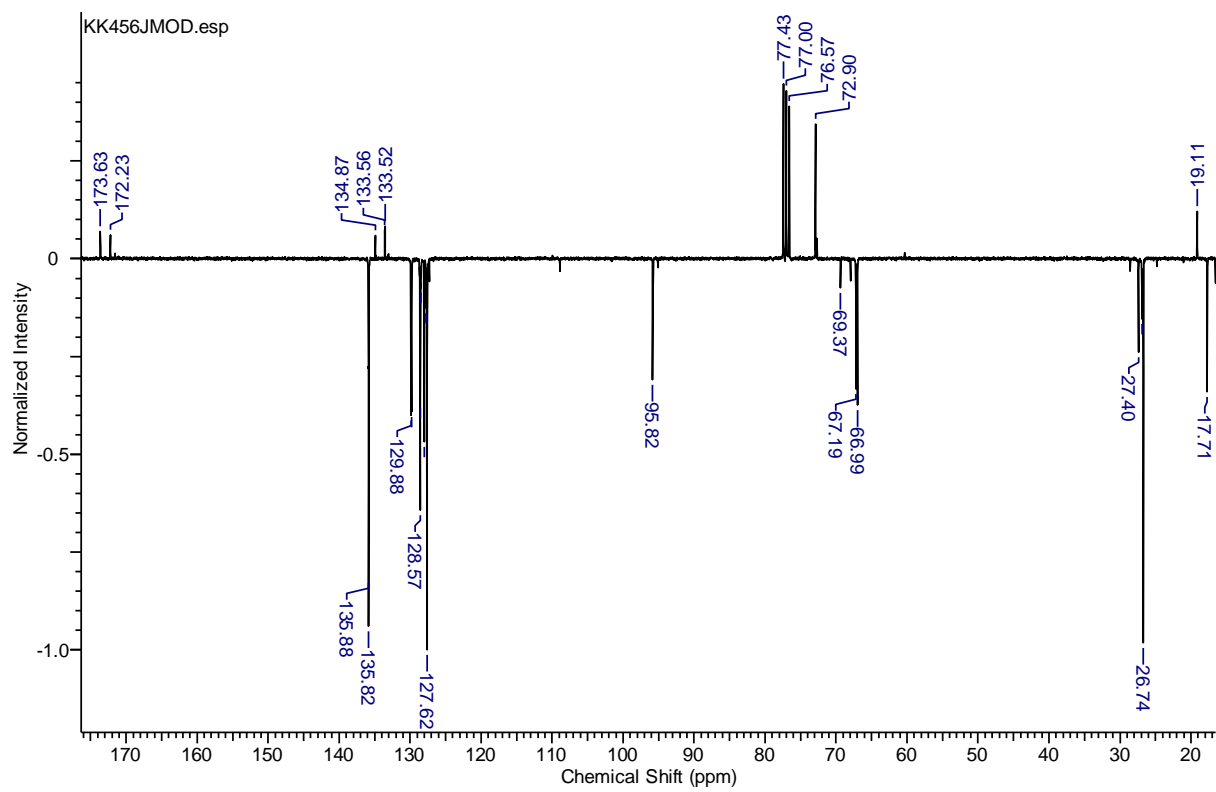
(S)-5-((R) 1-(*tert*butyl-diphenyl-silyl)oxy-ethyl⁷⁸)-4-benzyloxy-1-methyl⁷⁹-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on 263



Die komplette Route zum TBDPS- Allomethioisetin erfolgte über dieselben Methoden analog zu den Synthesen zum TIPS- Allomethioisetin (Anhang Manuskript 3).

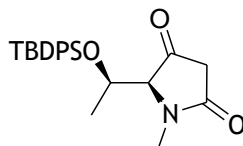
IR (ATR) ν_{\max} 2932, 2858, 1687, 1621, 1427, 1390, 1352, 1309, 1225, 1201, 1104, 997, 822, 803, 740, 701, 610; ¹H-NMR (300 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.01 (s, 9 H), 1.05 (d, $J=6.3$ Hz, 3 H), 2.56 (s, 3 H), 3.73 (d, $J=2.7$ Hz, 1 H), 4.16 (qd, $J=6.3, 2.7$ Hz, 1 H), 4.90 (d, $J=11.4$ Hz, 1 H), 4.95 (d, $J=11.4$ Hz, 1 H), 5.15 (s, 1 H), 7.29 - 7.45 (m, 11 H), 7.64 (dd, $J=8.2, 1.4$ Hz, 2 H), 7.67 (dd, $J=8.2, 1.4$ Hz, 2 H); ¹³C-NMR (75 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 17.7, 19.1, 26.7, 26.9, 27.4, 67.0, 67.2, 69.4, 72.9, 95.8, 127.6, 128.0, 128.5, 128.6, 129.8, 129.9, 133.5, 133.6, 134.9, 135.8, 135.9, 172.2, 173.6; HRMS (ESI) m/z : $[M-H]^-$ für C₃₀H₃₄NO₃Si⁻ berechnet: 484.2303, gefunden: 484.2299.





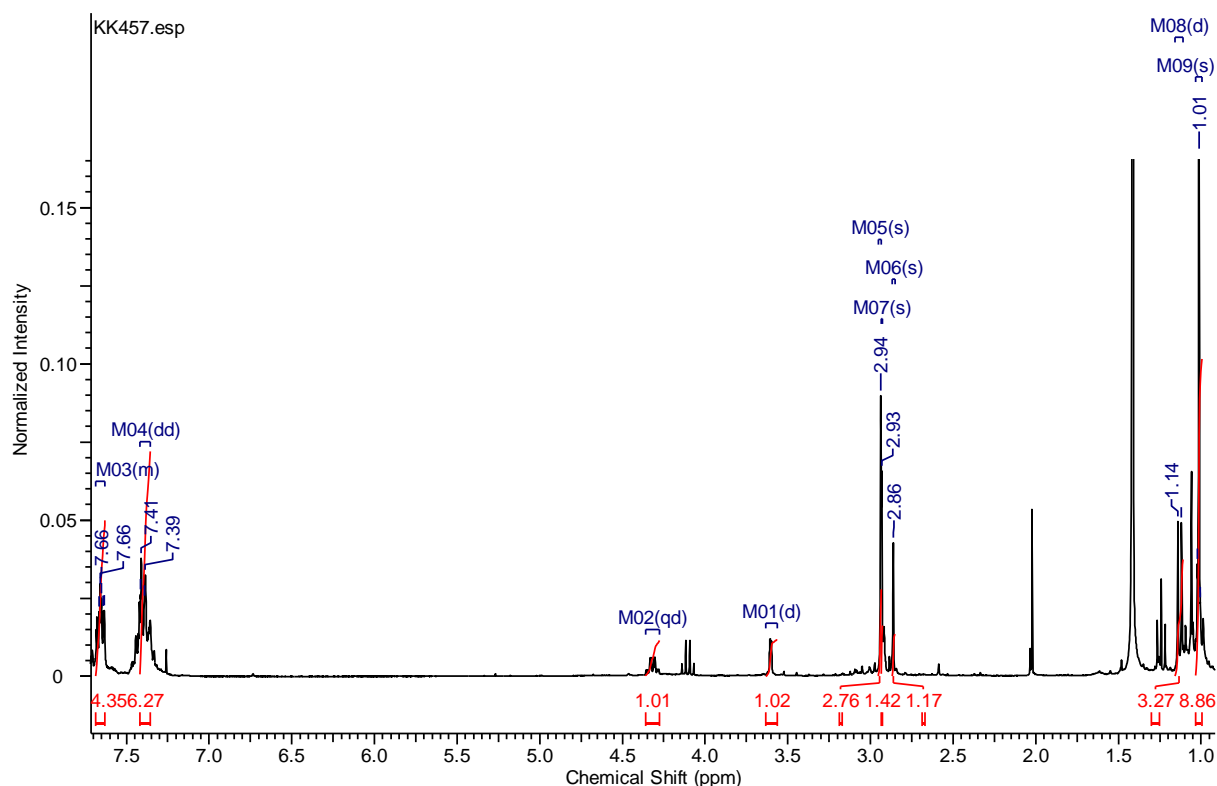
(S)-5-((R) 1-(*tert*butyl-diphenyl-silyl)oxy-ethyl)- 1-methyl-pyrrolidin-2,4-dion

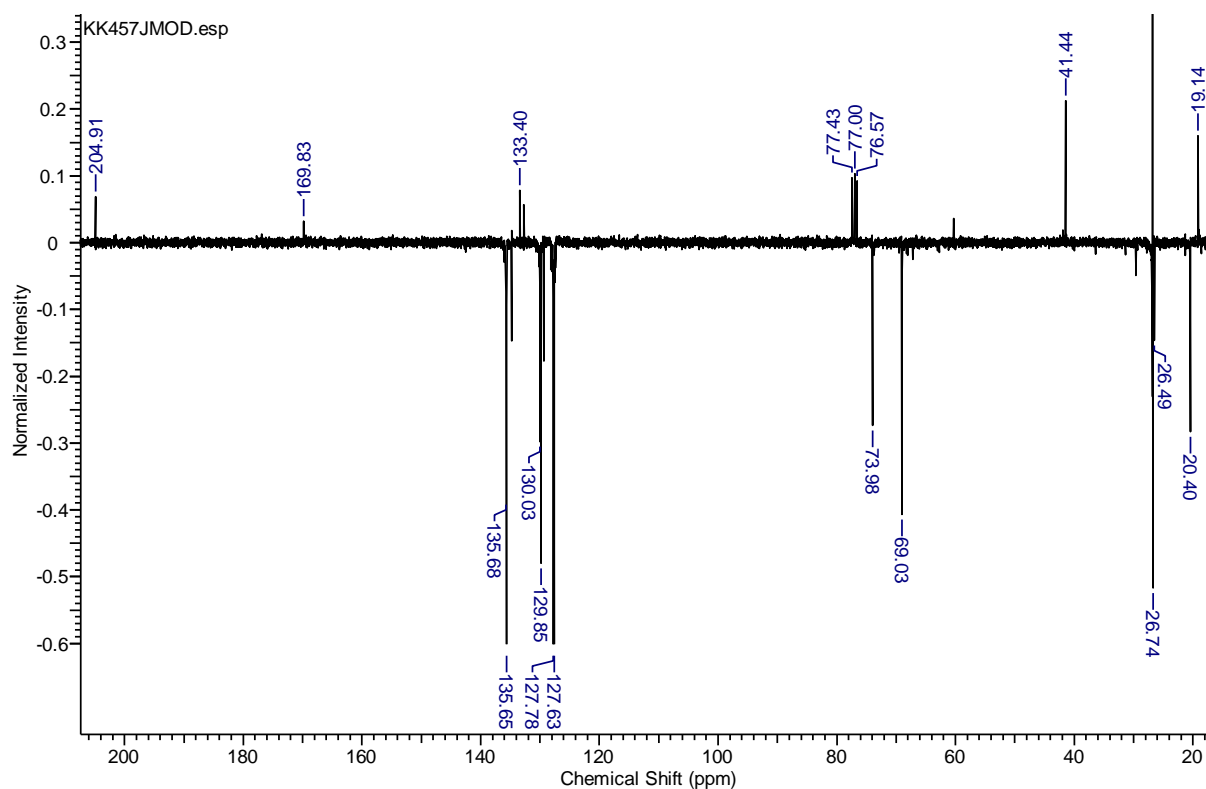
259



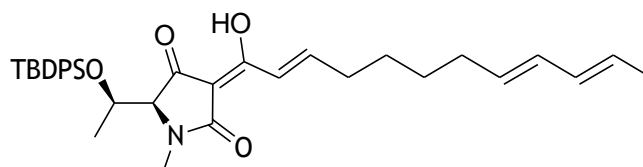
Die komplette Route zum TBDPS- Allomethioisetin erfolgte über dieselben Methoden analog zu den Synthesen zum TIPS- Allomethioisetin (Anhang Manuskript 3).

IR (ATR) ν_{\max} 2931, 2858, 1772, 1697, 1428, 1377, 1245, 1105, 997, 971, 908, 821, 738, 701, 647, 612; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 1.01 (s, 9 H), 1.13 (d, $J=6.6$ Hz, 3 H), 2.86 (s, 1 H), 2.93 (s, 1 H), 2.94 (s, 3 H), 3.60 (d, $J=2.3$ Hz, 1 H), 4.32 (qd, $J=6.6, 2.3$ Hz, 1 H), 7.40 (dd, $J=7.3, 1.8$ Hz, 6 H), 7.63 - 7.69 (m, 4 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 19.1, 20.4, 26.5, 26.7, 41.4, 69.0, 74.0, 127.6, 127.8, 129.9, 130.0, 133.4, 135.7, 135.7, 169.8, 204.9; HRMS (ESI) m/z : $[\text{M-H}]^-$ für $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{NO}_3\text{Si}^-$ berechnet: 394.1833, gefunden: 394.1829; $[\text{M+H}]^+$ für $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{NO}_3\text{Si}^+$ berechnet: 396.1990, gefunden: 396.1976.



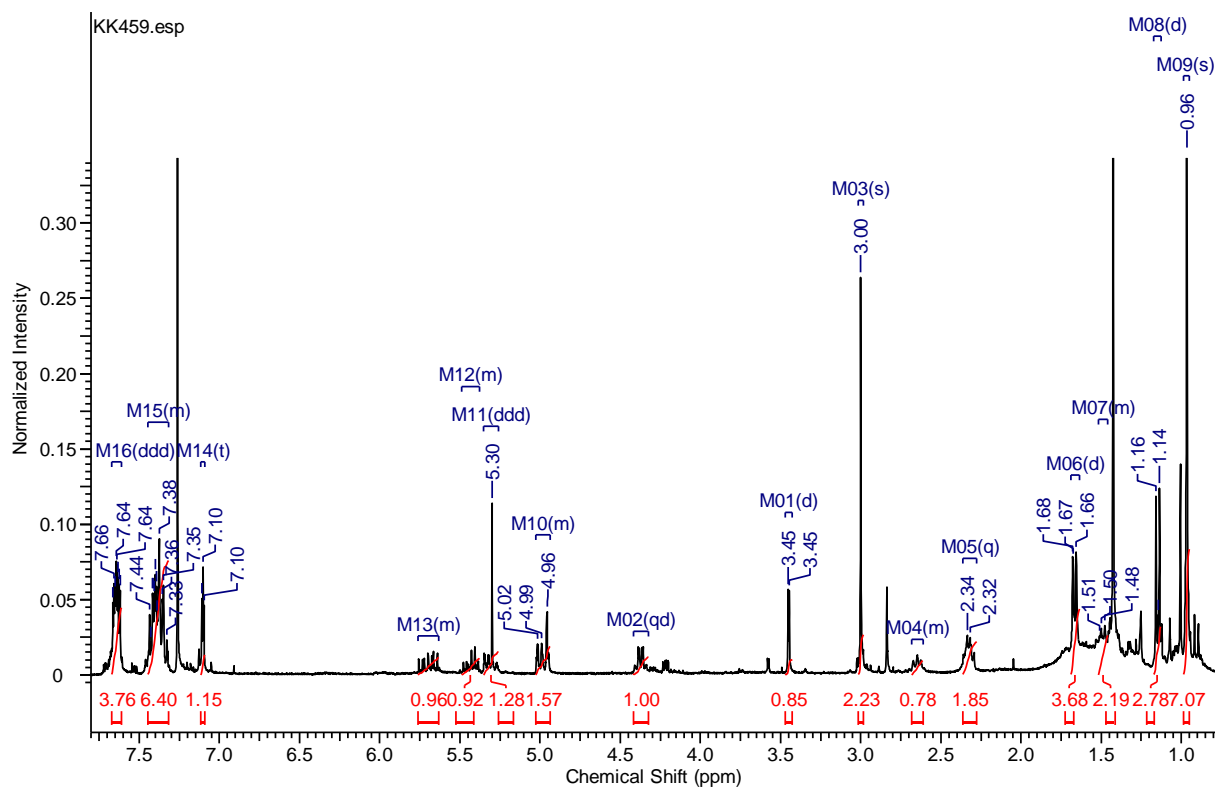


(5S)-((1R)- TBDPS-oxyethyl)-1-methyl-3-((2E,8E,10E)-dodecatrienoyl)-pyrrolidin-2,4-dion **260**

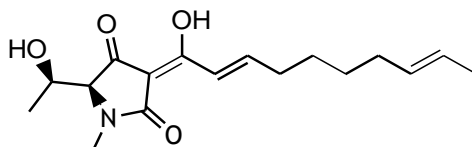


Die komplette Route zum TBDPS- Allomethiosetin erfolgte über dieselben Methoden analog zu den Synthesen zum TIPS- Allomethiosetin (Anhang Manuskript 3).

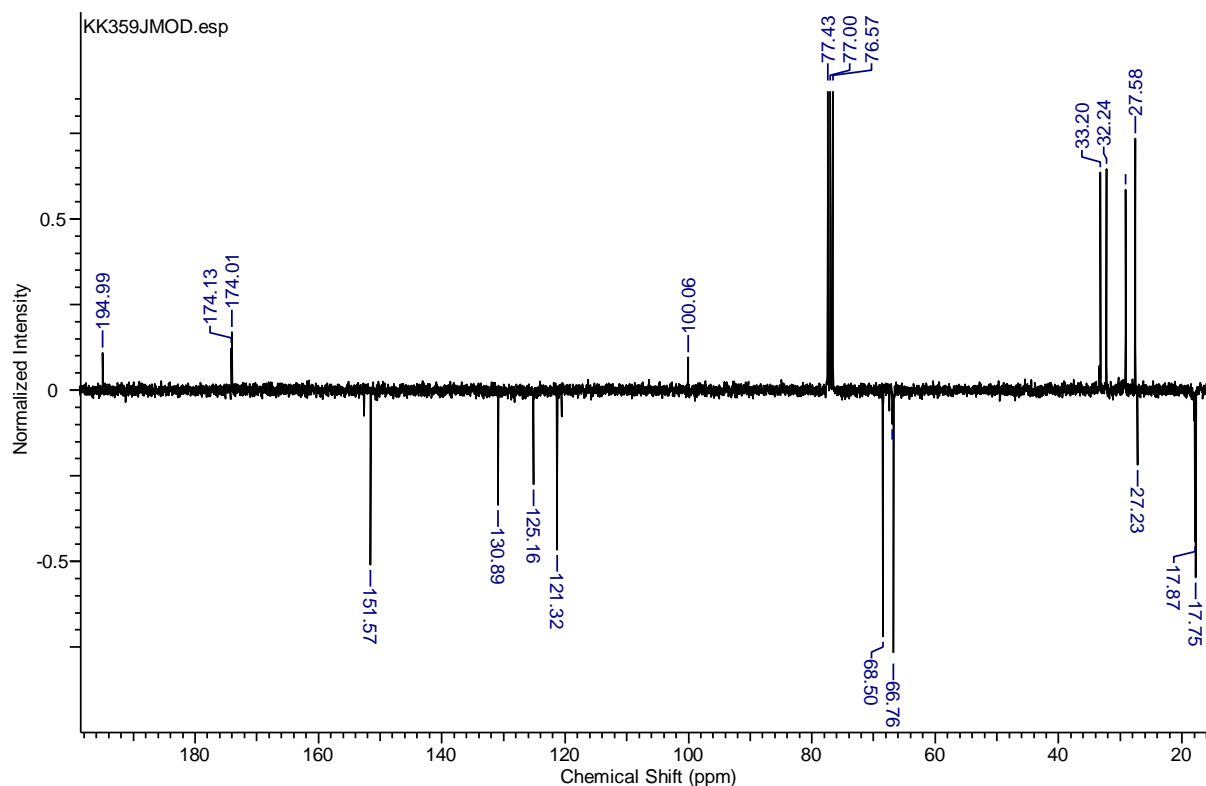
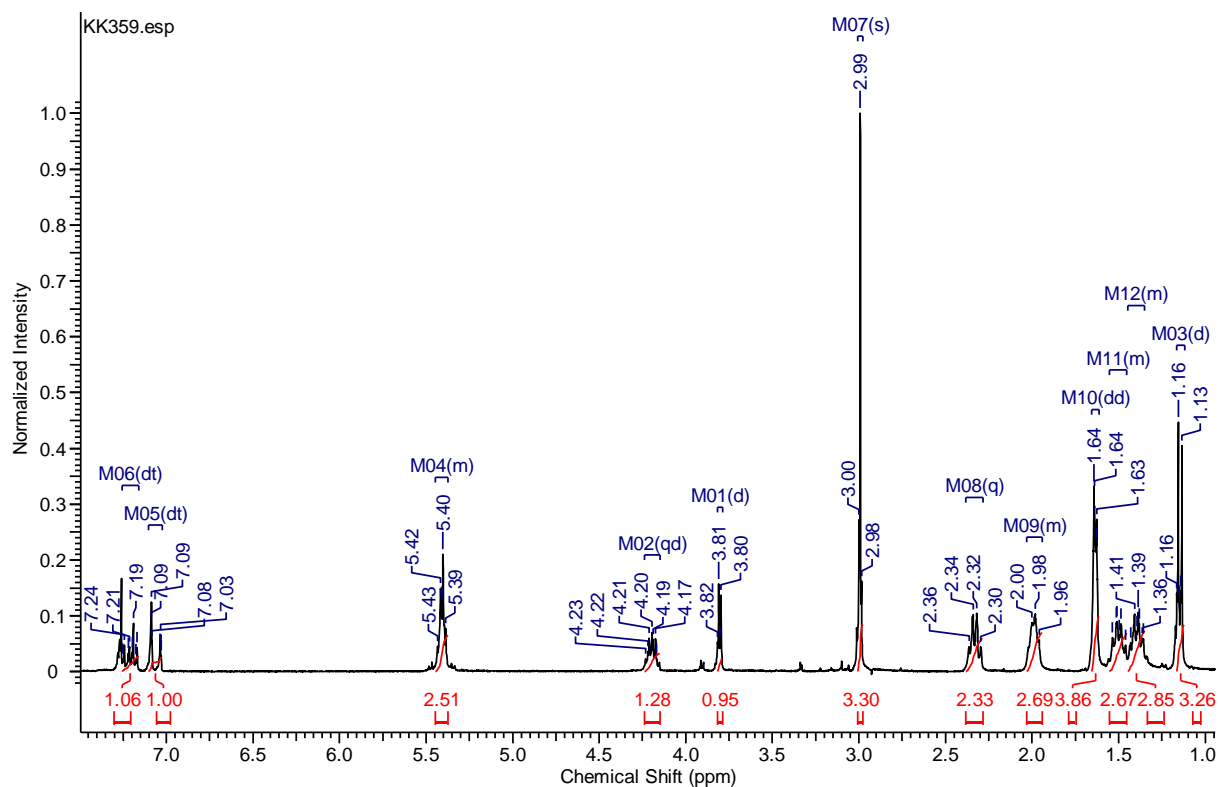
IR (ATR) ν_{\max} 2929, 2857, 1706, 1645, 1582, 1428, 1376, 1261, 1214, 1137, 1105, 986, 924, 821, 740, 701 ^1H NMR (300 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 0.96 (s, 8 H), 1.15 (d, $J=6.6$ Hz, 3 H), 1.46 - 1.52 (m, 2 H), 1.67 (d, $J=6.3$ Hz, 3 H), 2.33 (q, $J=5.5$ Hz, 2 H), 2.61 - 2.68 (m, 1 H), 3.00 (s, 3 H), 3.45 (d, $J=1.9$ Hz, 1 H), 4.37 (qd, $J=6.6, 2.0$ Hz, 1 H), 4.94 - 5.03 (m, 2 H), 5.31 (ddd, $J=15.1, 7.1, 1.4$ Hz, 1 H), 5.38 - 5.49 (m, 2 H), 5.63 - 5.76 (m, 2 H), 7.10 (t, $J=1.9$ Hz, 1 H), 7.32 - 7.45 (m, 6 H), 7.64 (ddd, $J=7.8, 4.3, 1.6$ Hz, 4 H); HRMS (ESI) m/z : $[\text{M-H}]^-$ für $\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{NO}_4\text{Si}^-$ berechnet: 570.3034, gefunden: 570.3030; $[\text{M+H}]^+$ für $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{NO}_4\text{Si}^+$ berechnet: 572.3191, gefunden: 572.3178.



(5S)-((1R)-hydroxyethyl)-1-methyl-3-((2E,8E)-decadienoyl)-pyrrolidin-2,4-dione 264

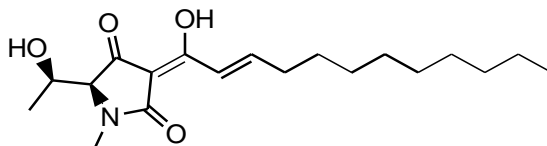


IR (ATR) ν_{max} 3448 (br), 2968, 2930, 2859, 1696, 1644, 1582, 1454, 1406, 1373, 1214, 1122, 1089, 984, 967, 843, 734; ^1H NMR (300 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 1.15 (d, $J=6.6$ Hz, 3 H), 1.35 - 1.45 (m, 2 H), 1.45 - 1.55 (m, 2 H), 1.64 (dd, $J=3.7, 1.0$ Hz, 4 H), 1.94 - 2.03 (m, 2 H), 2.33 (pseudo-q, $J=7.0$ Hz, 2 H), 2.99 (s, 3 H), 3.80 (d, $J=4.4$ Hz, 1 H), 4.19 (qd, $J=6.6, 4.4$ Hz, 1 H), 5.37 - 5.45 (m, 2 H), 7.06 (dt, $J=15.4, 1.4$ Hz, 1 H), 7.22 (dt, $J=15.4, 7.0$ Hz, 1 H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 17.8, 17.9, 27.2 (NMe), 27.6, 29.1, 32.2, 33.2, 66.8, 68.5, 100.1, 121.3, 125.2, 130.9, 151.6, 174.0, 174.1, 195.0 (s)

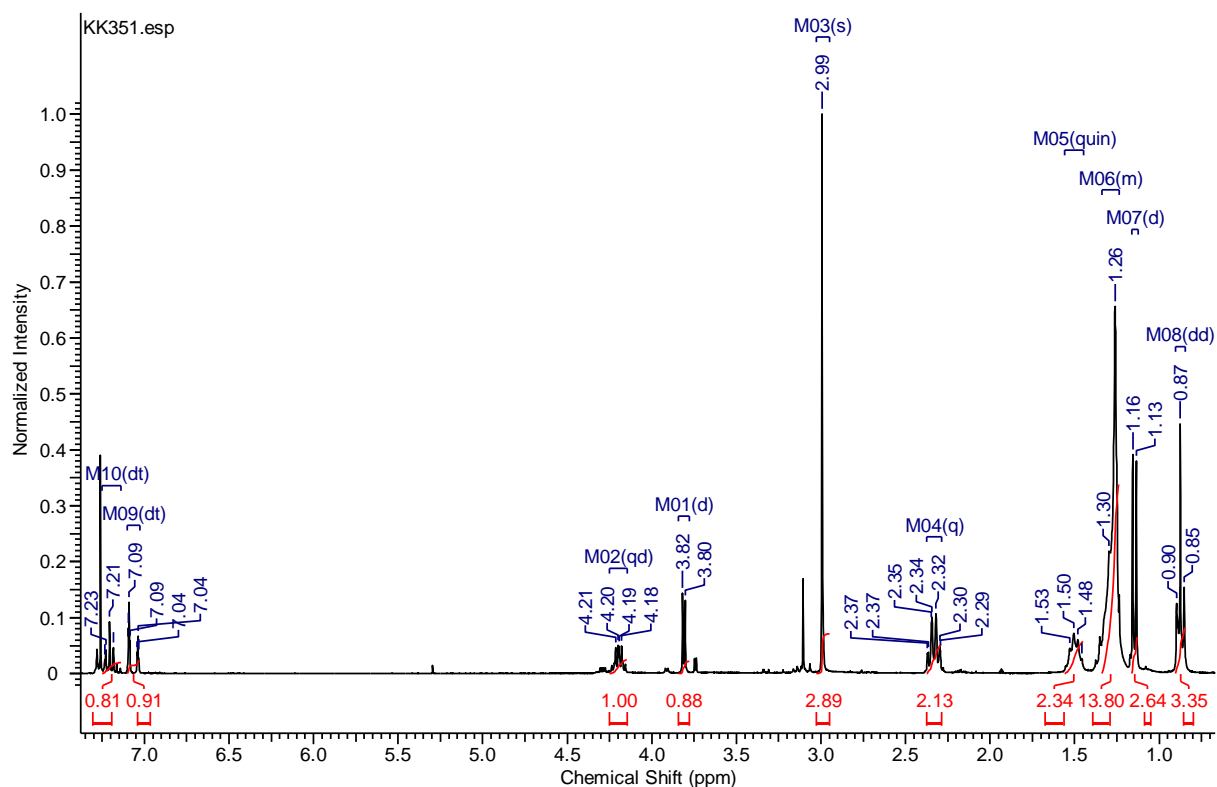


(5S)-((1R)- hydroxyethyl)-1-methyl-3-((2E)- dodecenoyl)-pyrrolidin-2,4-dion

265

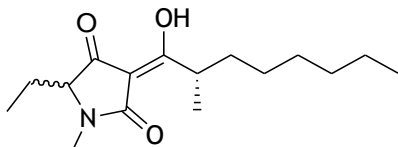


IR (ATR) ν_{\max} 3431 (br), 2925, 2855, 1699, 1645, 1583, 1460, 1411, 1377, 1257, 1216, 1119, 1093, 986, 562; ^1H NMR (300 MHz, CHCl_3 - d) δ ppm 0.88 (dd, $J=7.0$, 6.6 Hz, 3 H), 1.15 (d, $J=6.6$ Hz, 3 H), 1.24 - 1.34 (m, 12 H), 1.50 (quin, $J=7.1$ Hz, 2 H), 2.33 (pseudo-q, $J=6.9$ Hz, 2 H), 2.99 (s, 3 H), 3.81 (d, $J=4.7$ Hz, 1 H), 4.20 (qd, $J=6.4$, 4.5 Hz, 1 H), 7.06 (dt, $J=15.6$, 1.2 Hz, 1 H), 7.23 (dt, $J=15.6$, 6.9 Hz, 1 H);



Hydro- Penicillenol B 266

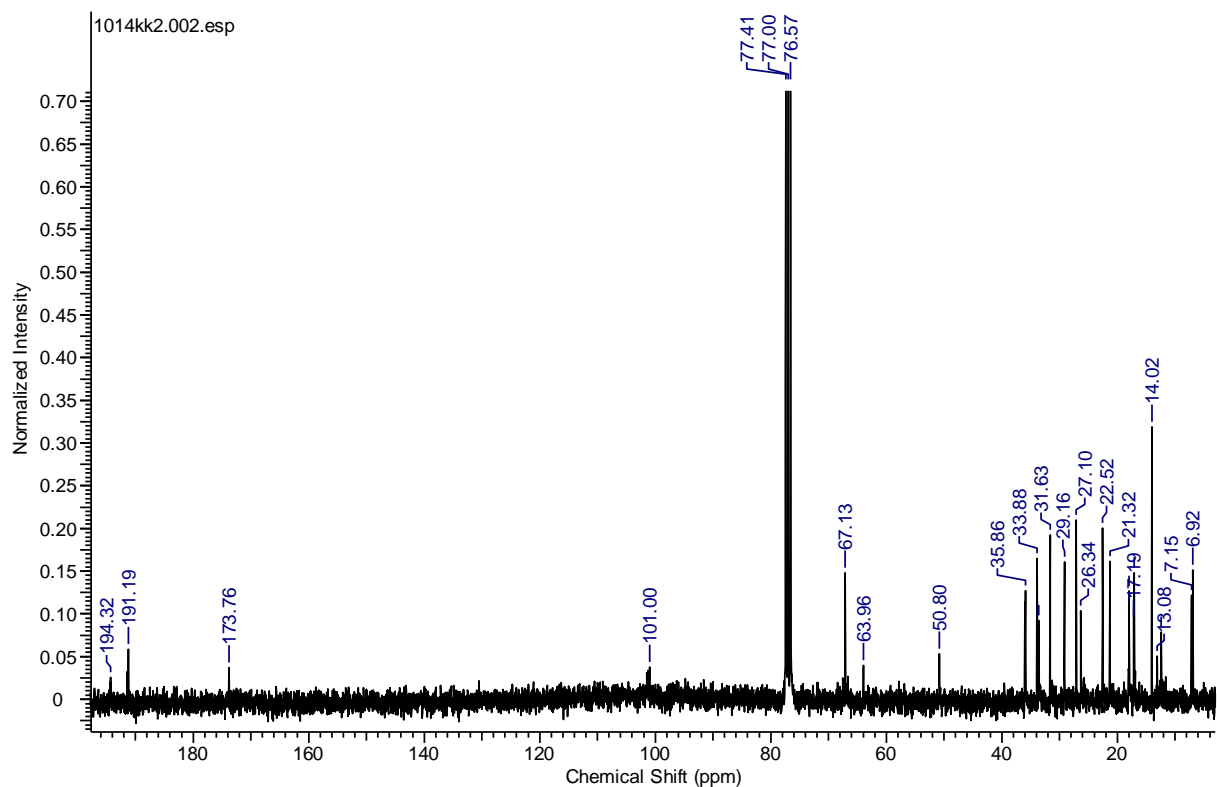
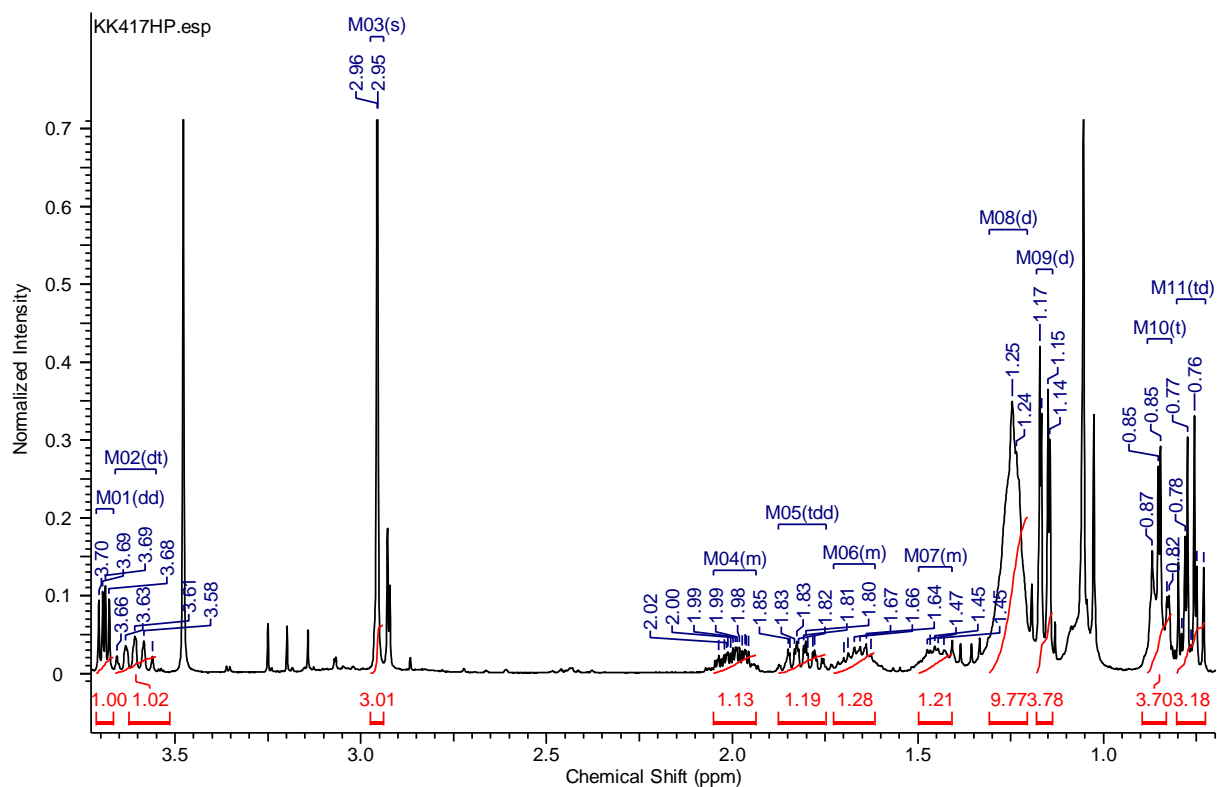
5-(*R/S*-ethyl)-3-(1-hydroxy-2(*S*)-methyloctylden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion



Diastereomer A/ Diastereomer B

IR (ATR) ν_{\max} 2960, 2929, 2861, 1708, 1646, 1614, 1486, 1456, 1381, 1341, 1262, 1218, 1092, 956, 883, 818, 765, 682; ^1H NMR (300 MHz, CHCl_3 - d) δ ppm 0.76/ 0.77 (t, $J=7.5$ Hz, 3 H), 0.85 (t, $J=6.9$ Hz, 3 H), 1.16 (d, $J=6.9$ Hz, 3 H), 1.21 - 1.29 (m, 6 H), 1.41 - 1.50 (m, 1 H), 1.62 - 1.73 (m, 1 H), 1.81 (tdd, $J=7.2$, 7.2, 5.6, 1.4 Hz, 1 H), 1.94 - 2.05 (m, 1 H), 2.95/ 2.96

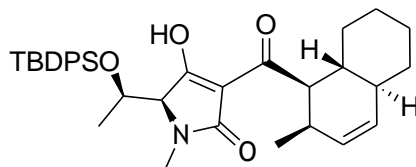
(s, 3 H), 3.61 (dt, $J=14.5, 7.2$ Hz, 1 H), 3.69 (dd, $J=5.2, 3.0$ Hz, 1 H); ^{13}C NMR (75 MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm 6.9/ 7.2, 14.0, 17.1/ 17.2, 17.9/ 18.0, 21.3/ 21.4, 22.5, 27.1/ 27.2, 29.2, 31.63/ 31.66, 33.6/ 33.9, 35.9/ 36.0, 67.10/ 67.13, 101.0, 173.8, 191.2/ 191.4, 194.26/ 194.32



5.4 Octalinoyltetramsäuren

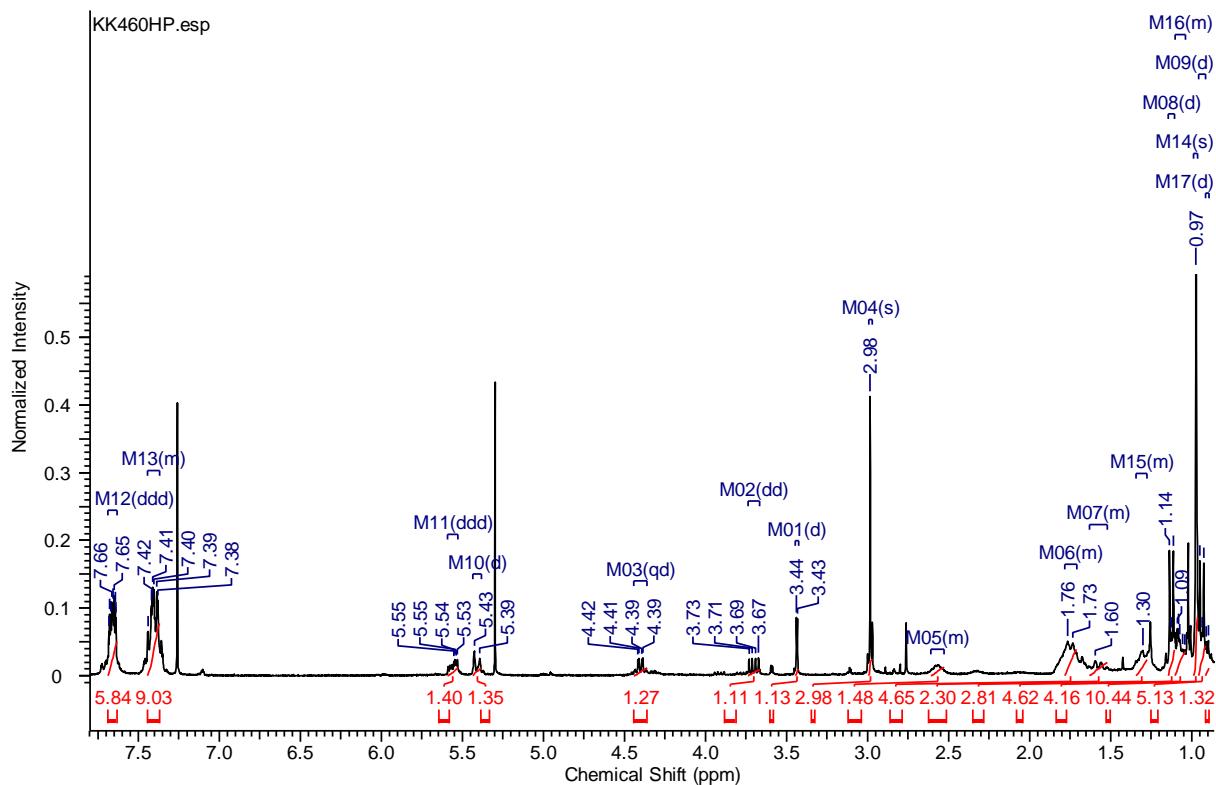
TBDPS- Allomethioetin **267**

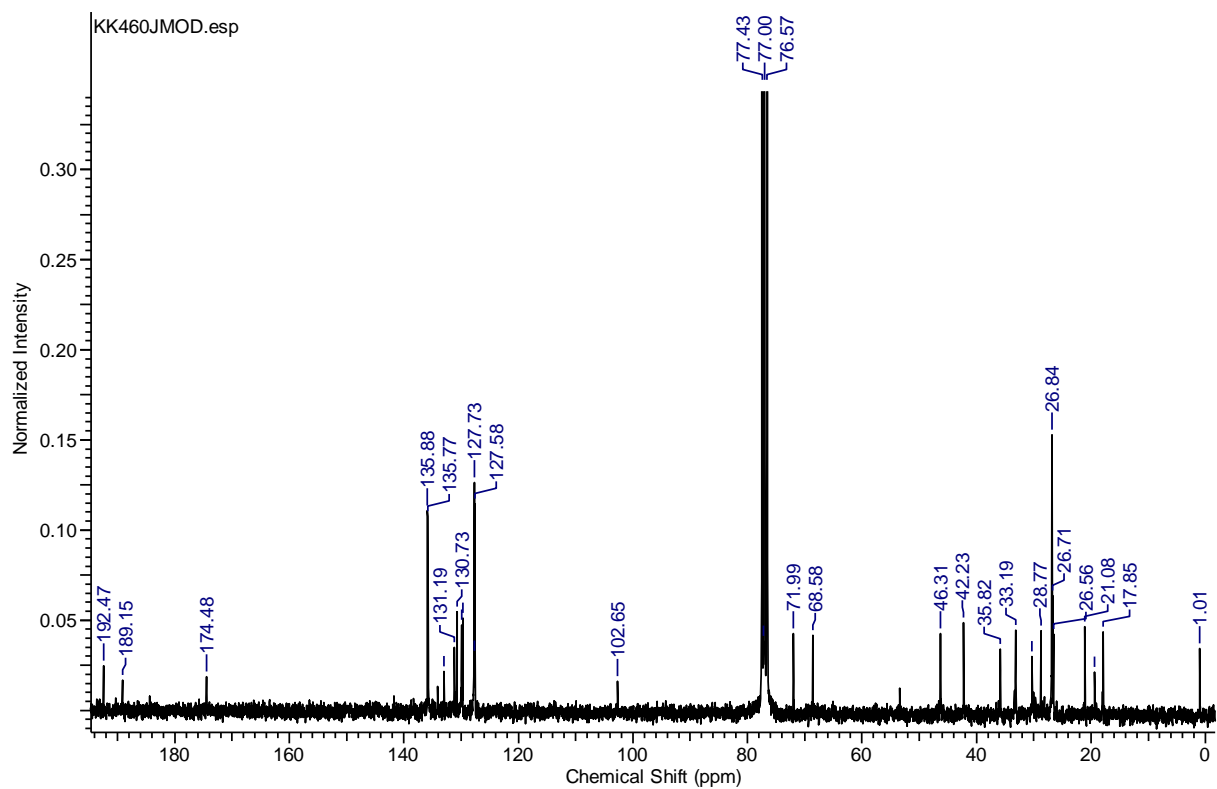
(5S)-((1'R)- *tert*butyl-diphenyl-silyloxyethyl)-1-methyl-3-((1R,2R,4aS,8aR)-1,2,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-2-methylnaphthalin-1-carbonyl)pyrrolidin-2,4-dion



Die komplette Route zum TBDPS- Allomethioetin erfolgte über dieselben Methoden analog zu den Synthesen zum TIPS- Allomethioetin (Anhang Manuskript 3).

IR (ATR) ν_{\max} 2964, 2927, 2854, 1710, 1651, 1606, 1487, 1428, 1392, 1376, 1330, 1262, 1216, 1137, 1105, 995, 975, 929, 821, 785, 736, 701; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 0.90 (d, $J=3.8$ Hz, 1 H), 0.94 (d, $J=7.1$ Hz, 3 H), 0.97 (s, 9 H), 1.04 - 1.10 (m, 4 H), 1.12 (d, $J=6.9$ Hz, 3 H), 1.28 - 1.34 (m, 2 H), 1.52 - 1.63 (m, 1 H), 1.71 - 1.78 (m, 4 H), 2.53 - 2.61 (m, 1 H), 2.98 (s, 3 H), 3.44 (d, $J=1.9$ Hz, 1 H), 3.70 (dd, $J=11.7, 5.9$ Hz, 1 H), 4.40 (qd, $J=6.9, 1.9$ Hz, 1 H), 5.41 (d, $J=9.9$ Hz, 1 H), 5.56 (ddd, $J=9.9, 4.4, 2.5$ Hz, 1 H), 7.37 - 7.44 (m, 6 H), 7.66 (ddd, $J=7.9, 3.9, 1.6$ Hz, 4 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 1.0, 17.8, 19.3, 21.1, 26.6, 26.7, 26.8, 26.8, 28.8, 30.3, 33.1, 33.2, 35.8, 42.2, 46.3, 68.6, 72.0, 102.6, 127.6, 127.7, 127.7, 129.7, 129.9, 130.7, 131.2, 133.0, 135.8, 135.9, 174.5, 189.1, 192.5

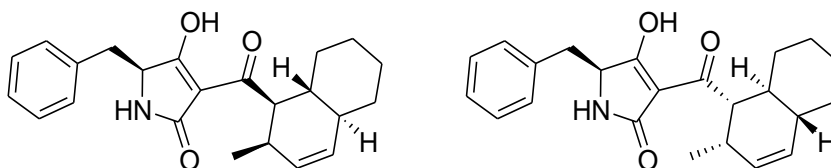




Phenyl- TA289 268

5S- benzyl- 3-((1R,2R,4aS,8aR)- 1,2,4a,5,6,7,8,8a- octahydro-2- methylnaphthalin-1- carbonyl)- pyrrolidin-2,4-dion

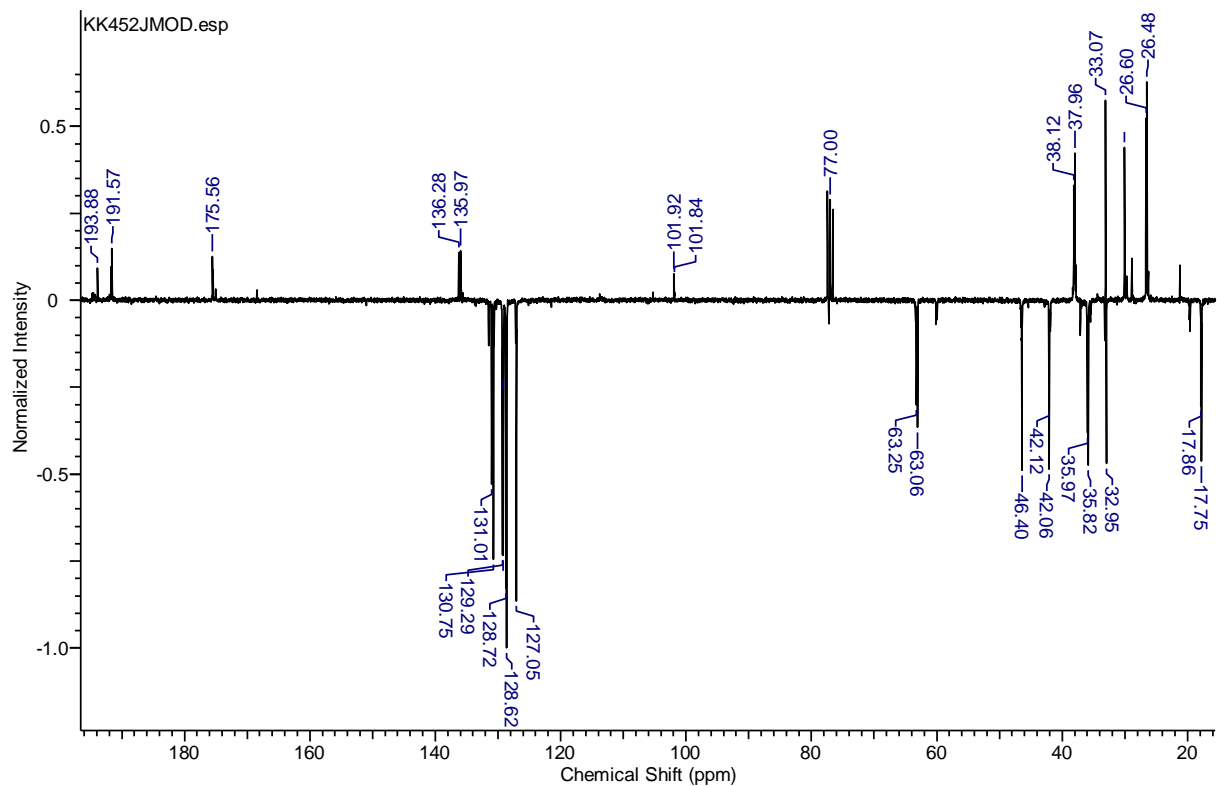
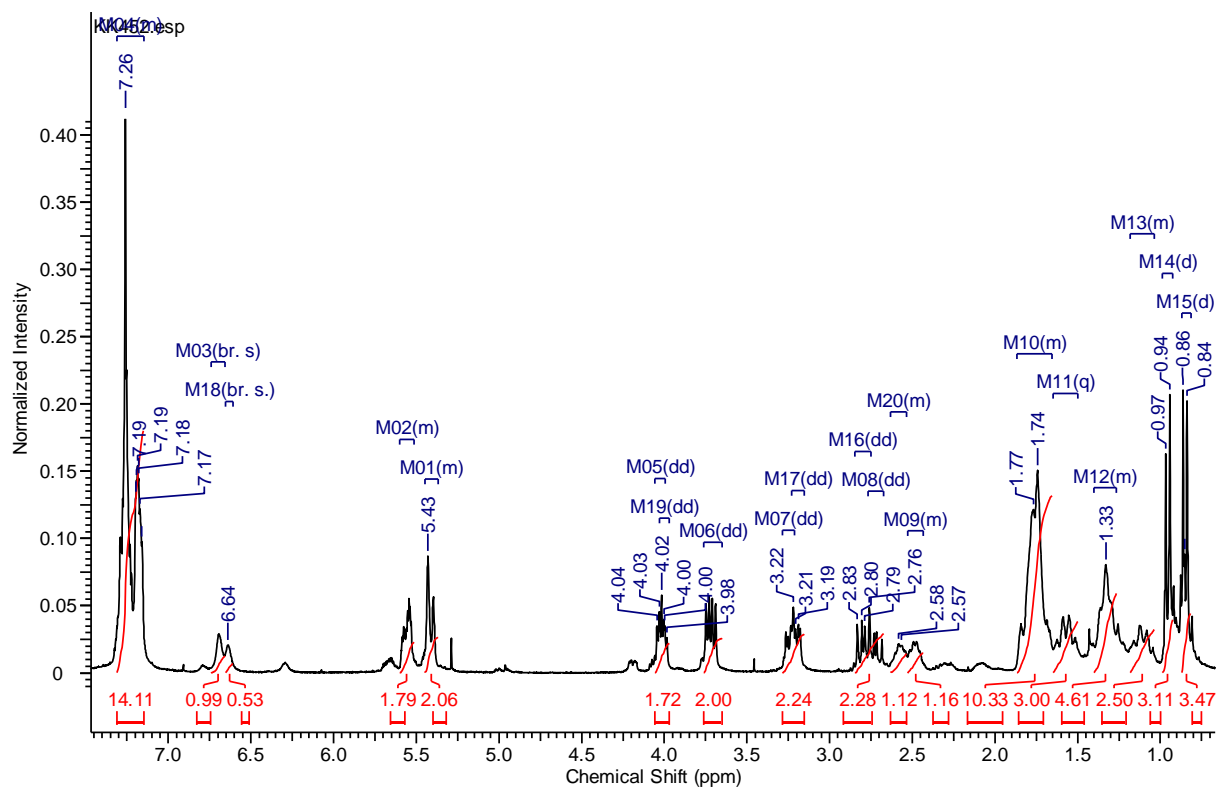
5S- benzyl- 3-((1S,2S,4aR,8aS)- 1,2,4a,5,6,7,8,8a- octahydro-2- methylnaphthalin-1- carbonyl)- pyrrolidin-2,4-dion



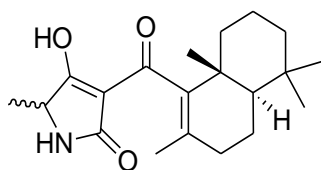
Diastereomer A / Diastereomer B

Synthese analog zu Allomethioisetin (Anhang Manuskript 3) über Zyklisierung mit Me_2AlCl , Umkomplexierung mit BF_3OEt_2 und Hydrolyse des BF_2 - Komplexes.

IR (ATR) ν_{max} 3217 (br), 2923, 2852, 1692, 1654, 1596, 1497, 1454, 1374, 1336, 1279, 1259, 1084, 1020, 982, 907, 849, 802, 728, 698; ^1H NMR (300 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.85 (d, $J=7.1$ Hz, 3 H) / 0.95 (d, $J=7.1$ Hz, 3 H), 1.04 - 1.18 (m, 1+1 H), 1.26 - 1.40 (m, 2+2 H), 1.57 (pseudo-q, $J=10.8$ Hz, 1+1 H), 1.65 - 1.87 (m, 4+4 H), 2.43 - 2.53 (m, 1 H) / 2.53 - 2.63 (m, 1 H), 2.72 (dd, $J=13.8, 9.6$ Hz, 1 H) / 2.80 (dd, $J=13.4, 8.5$ Hz, 1 H), 3.21 (dd, $J=13.8, 3.8$ Hz, 1 H) / 3.24 (dd, $J=13.4, 4.1$ Hz, 1 H), 3.72 (dd, $J=11.8, 6.0$ Hz, 1+1 H), 4.01 (dd, $J=9.6, 3.8$ Hz, 1 H) / 4.02 (dd, $J=8.5, 4.1$ Hz, 1 H), 5.37 - 5.45 (m, 1+1 H), 5.51 - 5.60 (m, 1+1 H), 6.64 (br. s., 1 H, NH) / 6.70 (br. s., 1 H), 7.15 - 7.31 (m, 5+5 H); ^{13}C NMR (75 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 17.8 / 17.9, 26.5 / 26.6 (CH_2), 30.1 (CH_2), 33.0 (CH), 33.1 (CH_2), 35.8 / 36.0 (CH), 38.0 / 38.1 (CH_2), 42.06 / 42.12 (CH), 46.4, 63.1 / 63.2, 101.8 / 101.9, 127.0, 128.6 / 128.7, 128.7, 129.2 / 129.3, 130.7, 131.0, 136.0 / 136.3, 175.5 / 175.6, 191.6 / 191.7, 193.9; HRMS (ESI) m/z : $[\text{M-H}]^-$ für $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{NO}_3^-$ berechnet: 364.1907, gefunden: 364.1922.



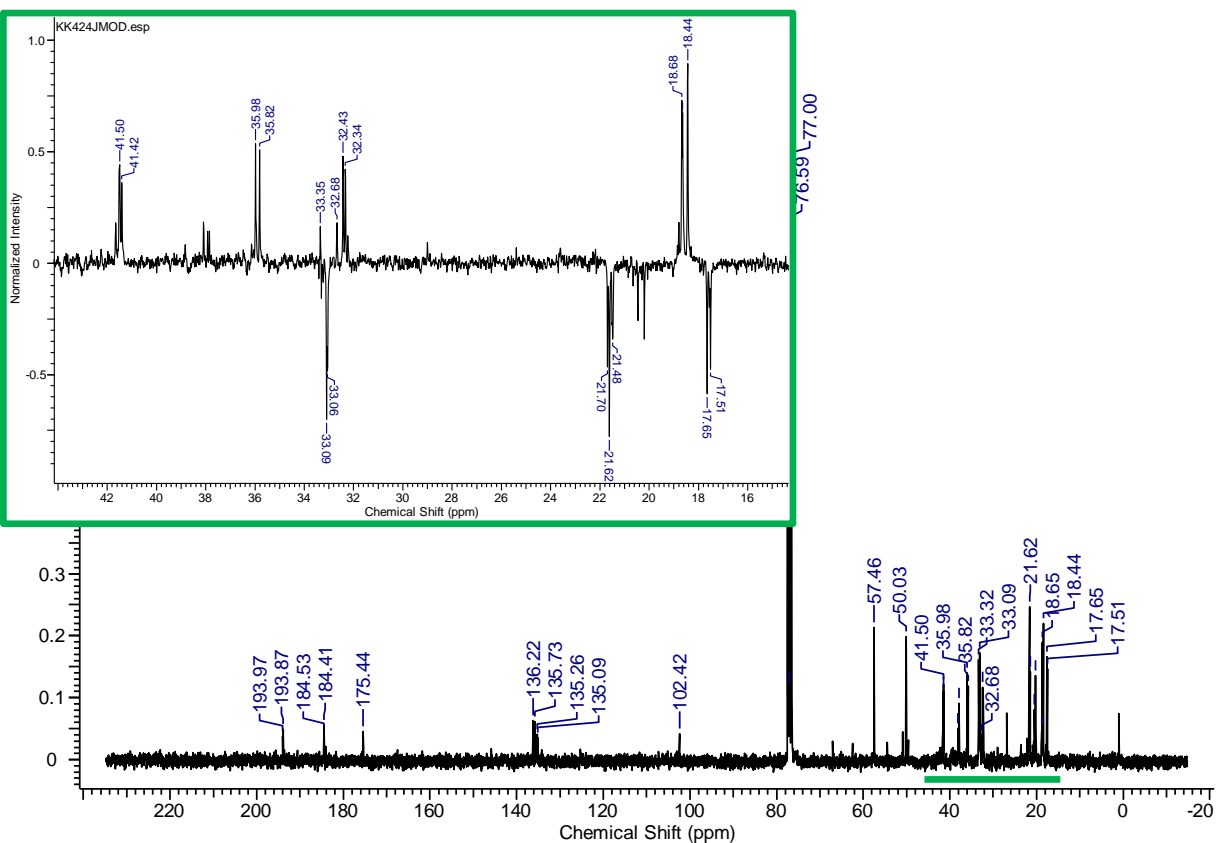
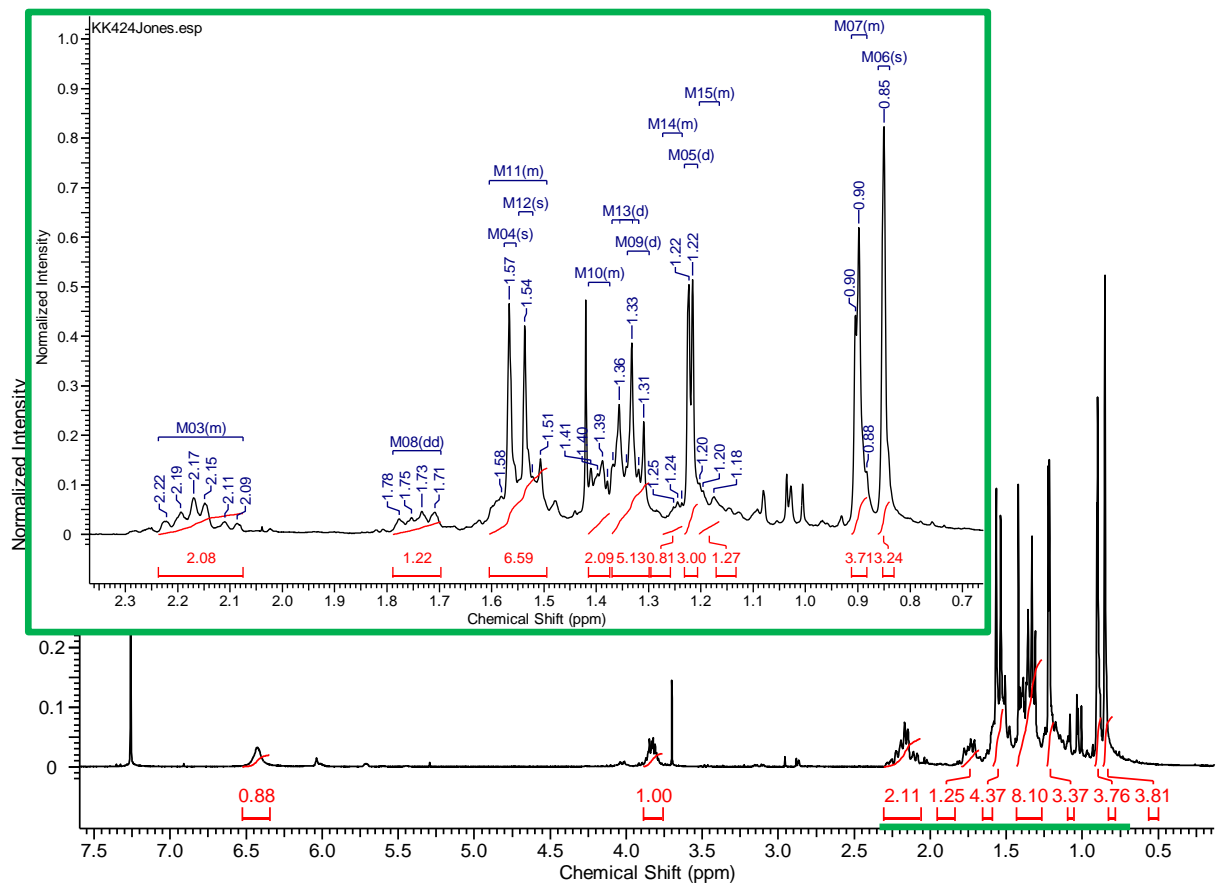
(5*R*/*S*)-Methyl-3-((4*aR*,8*aR*)-3,4,4*a*,5,6,7,8,8*a*-octahydro-2,5,5,8*a*-tetramethylnaphthalin-1-carbonyl)pyrrolidin-2,4-dione **269**



Diastereomer A/ Diastereomer B

N-Boc-5-methyltetramic acid **00** (1eq.), albicanoyl chloride⁸⁰ **18** (1eq.), and BF₃·OEt₂ (48% in diethyl ether, 7 mL/mmol) were heated in a sealed glass vial at 60 °C for 1 h. The mixture was allowed to cool to ambient temperature and partitioned between ethyl acetate and sat. aqueous NH₄Cl. The phases were separated, the water layer was extracted with ethyl acetate and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude BF₂-complex was hydrolyzed by boiling in MeOH for 2 h. The solvent was evaporated, the residue taken up in ethyl acetate and washed with water. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The free 3-acetyltetramic acid was purified by preparative HPLC (Kinetex C-18, 77% MeOH, after 15 min: ramp within 1 min to 80% MeOH, 0.1% HCOOH in the water fraction, *t_R* analyt: 20.7/21.1 min) to afford 1:1 diastereomeric mixture **00** as a yellow oil.

IR (ATR) ν_{max} 3240 (br), 2932, 2869, 1697, 1658, 1583, 1444, 1362, 1320, 1290, 1225, 1093, 1042, 966, 907, 868, 847, 797, 729; ¹H NMR (300 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.85 (s, 3 H), 0.90 (s, 3 H), 1.16 - 1.20 (m, 1 H), 1.216/ 1.223 (s, 3 H), 1.24 - 1.27 (m, 1 H), 1.32 (d, *J*=6.9 Hz, 3 H)/ 1.34 (d, *J*=7.1 Hz, 2 H), 1.37 - 1.42 (m, 2 H), 1.49 - 1.60 (m, 4 H), 1.54/ 1.57 (s, 3 H), 1.74 (dd, *J*=13.2, 7.1 Hz, 1 H), 2.08 - 2.24 (m, 2 H), 3.82 (d, *J*=6.9 Hz, 1 H)/ 3.84 (q, *J*=7.1 Hz, 1 H), 6.43 (br. s., 1 H); ¹³C NMR (75 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 17.5 (Me), 17.6 (Me), 18.4 (CH₂), 18.7 (CH₂), 21.5 (Me), 21.6 (Me), 21.7 (Me), 32.3/ 32.4 (CH₂), 32.7 (C^q), 33.4 (C^q), 35.8/ 36.0 (CH₂), 41.4/ 41.5 (CH₂), 50.0, 57.5, 102.4, 135.1/ 135.3, 135.7/ 136.2, 175.4, 184.4/ 184.5, 193.9/ 194.0



6. Ausblick

Während der Experimente zur Darstellung der Decalinoyltetramsäuren, haben Markus und ich, auch unter Verwendung der Substanzen von Matthias Göhl⁸⁰ folgende Derivate dargestellt:

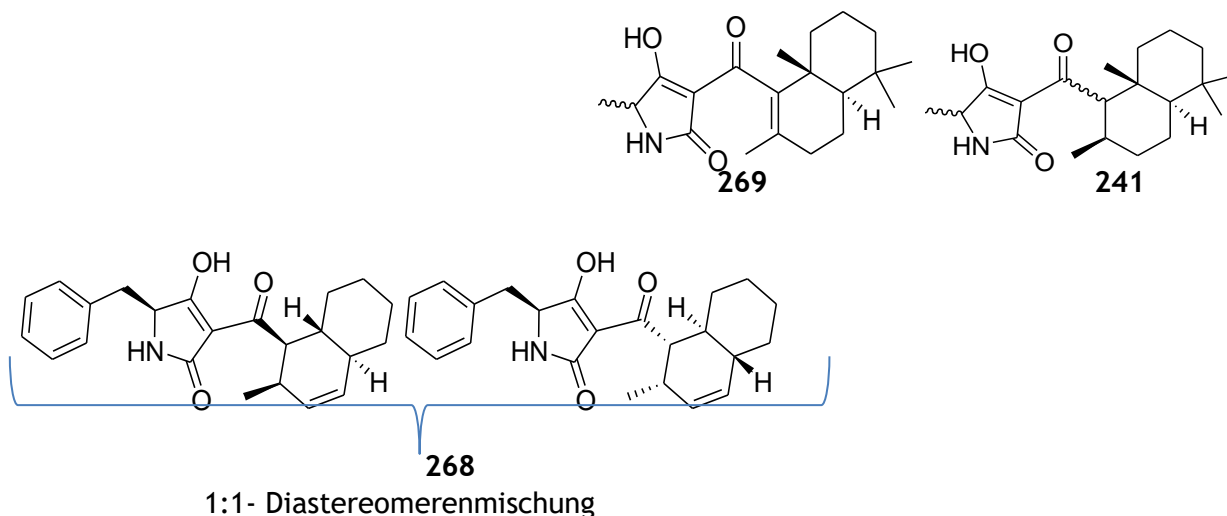


Abb.123: dargestellte Decalinoyltetramsäurederivate

Jene sind auch schon am HZI zu Braunschweig⁸¹ auf ihre antibiotische Aktivität untersucht worden. Betrachtet man die IC₅₀-Werte (Tabelle 9) hat sich das gesättigte Drimansäurederivat **241** als Aktivstes herausgestellt. Interessanterweise war das „Phenyl-TA289“ **268** etwas wirksamer gegen den grampositiven *Staphylococcus aureus* und das ungesättigte Isoalbicanoylderivat **269** etwas aktiver gegen die gramnegative *Escherichia coli*-Mutante. Allo-Methioisetin **234** zeigte kaum antibiotische Wirkung gegen *S. aureus* und keine gegen *E. coli*. Gegenüber dessen Wildtyp waren auch die anderen Derivate inaktiv; nur die Mutante *D21f2* mit einer durchlässigeren äußeren Membran zeigte gehemmtes Wachstum. Das bedeutet, dass z.B. **241** beim Menschen gegen Staphylokokken eingesetzt werden könnte, ohne die wichtigen Darmbakterien abzutöten.

Tabelle 9: antibiotische IC₅₀-Werte in µg/mL der vier Decalinoyltetramsäurederivate

Decalinoyltetramsäure	<i>E.coli</i> D21f2	<i>S. aureus</i>
269	4	6,7
241	1,4	1,4
268	18	4
234	Inaktiv	> 20

Die dosisabhängige Wachstumshemmung gegenüber *E. coli* (siehe Abb. 124a) zeigt bei geringen Konzentrationen eine etwas bessere Wirkung des gesättigten Drimansäurederivates **241** im Vergleich zum ungesättigten Isoalbicanylderivat **269**, wohingegen über 10 µg/mL **269** am aktivsten ist. Interessanterweise erreicht das „Phenyl-TA289“ **268** bei der höchsten gemessenen und bei geringen Konzentrationen von unter 1 µg/mL die höchste Wachstumshemmung gegenüber *S. aureus*, wohingegen bei mittleren Konzentrationen **241** am wirksamsten ist (Abb.124b).

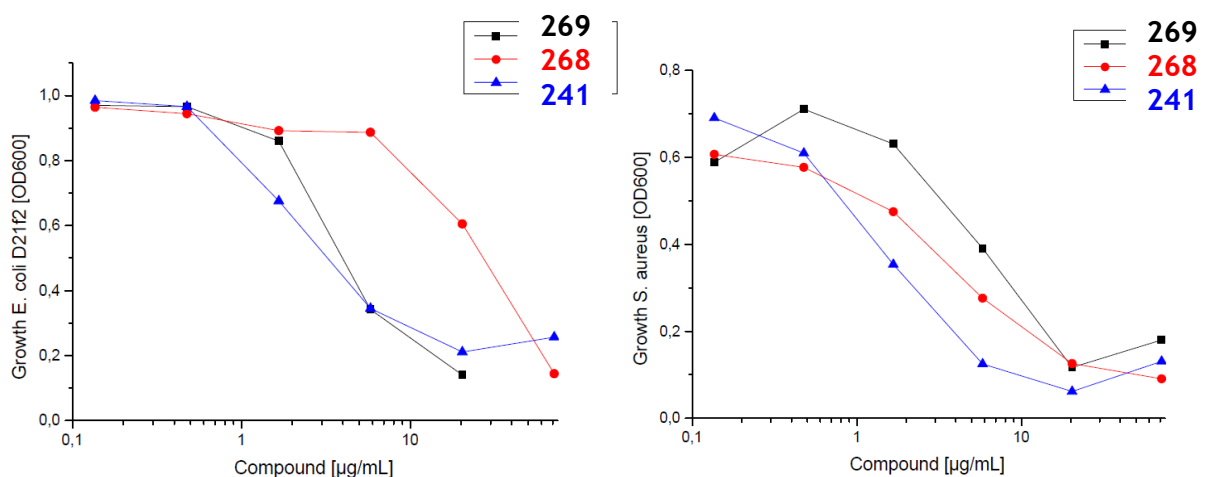


Abb. 124: dosisabhängige Wachstumshemmung der Decalinoyltetramsäuren gegenüber a) *E. coli* und b) *S. aureus*

Weiterhin habe ich zusätzlich zu den veröffentlichten Penicillenolen noch die folgenden Derivate für Biotests zur Struktur- Wirkungsbeziehung an das Institut für Pflanzenbiochemie in Halle geschickt.

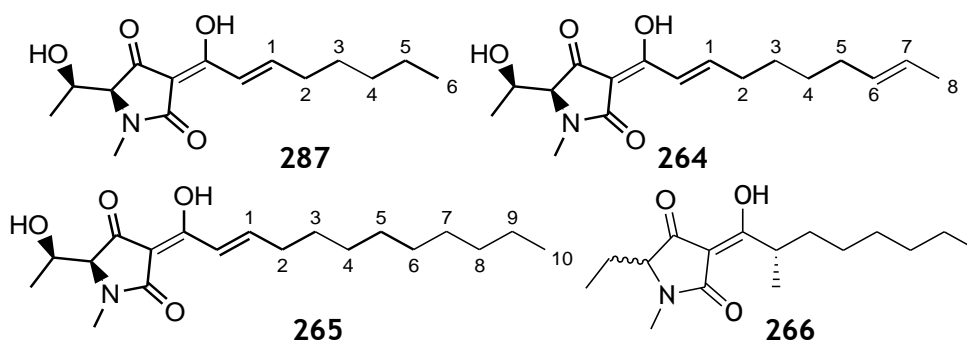


Abb.125: dargestellte nicht markierte Penicillenol- Derivate

Außerdem haben wir Drimenol **270** von Matthias Göhl erhalten, welchen ich als Test für **277** (siehe unten) zum Aldehyd **271** oxydieren und mit **148** umsetzen will.

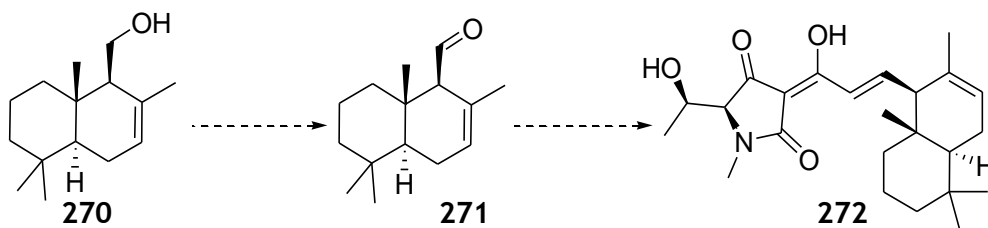


Abb. 126 geplanter Test für die Synthese von Octalinoyl- Aldehyden und deren Umsetzung mit Tetramsäure-3-Acyl-Yliden

Da ich die von Herrn Schobert vorgeschlagenen und im Rahmen dieser Arbeit schon untersuchten (*vide supra*), aber noch nicht vollständig charakterisierten Verbindungen ebenfalls fertigstellen will und ich auch schon genügend sauberes **168** vorbereitet habe, werde ich versuchen, solange ich noch keine Arbeitsstelle habe, die folgenden Derivate zu synthetisieren:

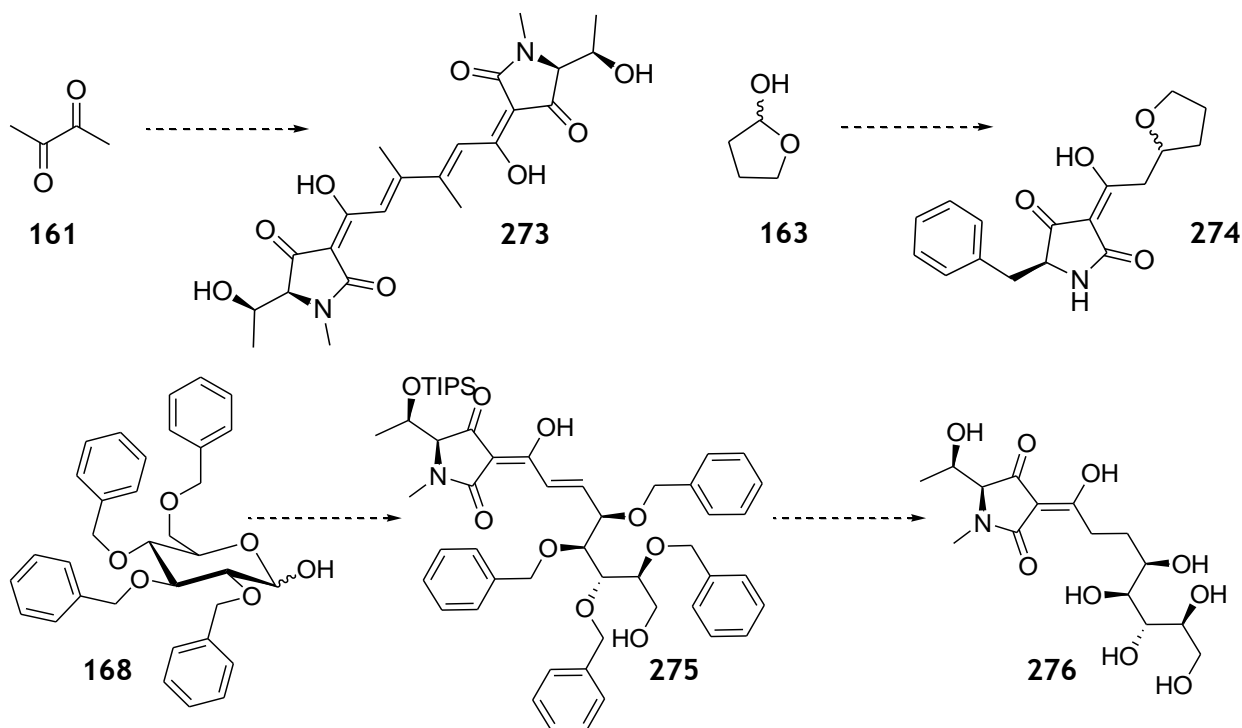


Abb. 127: geplante Fertigstellung neuer 3-Acyltetramsäuren aus Tetramsäure-3-Acyl-Yliden und verschiedenen Oxo- Komponenten

Der Grund dafür ist einerseits die Vergrößerung des Anwendbarkeitsspektrums der Tetramsäure- 3-Acyllyde und andererseits die Untersuchung der entstandenen Verbindungen auf biologische Aktivität.

Weiterhin hat sich durch die Zusammenarbeit mit Markus Winterer die Möglichkeit ergeben, ein zu Zopfiellamid **28** analoges Molekül **277** unter dreimaliger Verwendung von Ylid **43** zu synthetisieren. Dies „schließt gewissermaßen den Kreis auf mehreren Ebenen“; deshalb halte ich es für einen würdigen Schlusspunkt unter dieser Arbeit, weil es das von mir sehr häufig untersuchte **43** mit den Decalinoyltetramsäuren und einer weiteren Anwendung des von uns entwickelten Ylids **148** verbindet. Außerdem ist es eine Möglichkeit, die noch vorhandene stereoreine Octalinsäure **248** sinnvoll zu verwenden. Drittens ist es äußerst amüsant, nach der Synthese von Methiosetin **234**, diesem noch „den (um eine C₂- Einheit) längeren und den kürzeren (*vide infra*) Bruder beiseitezustellen“.

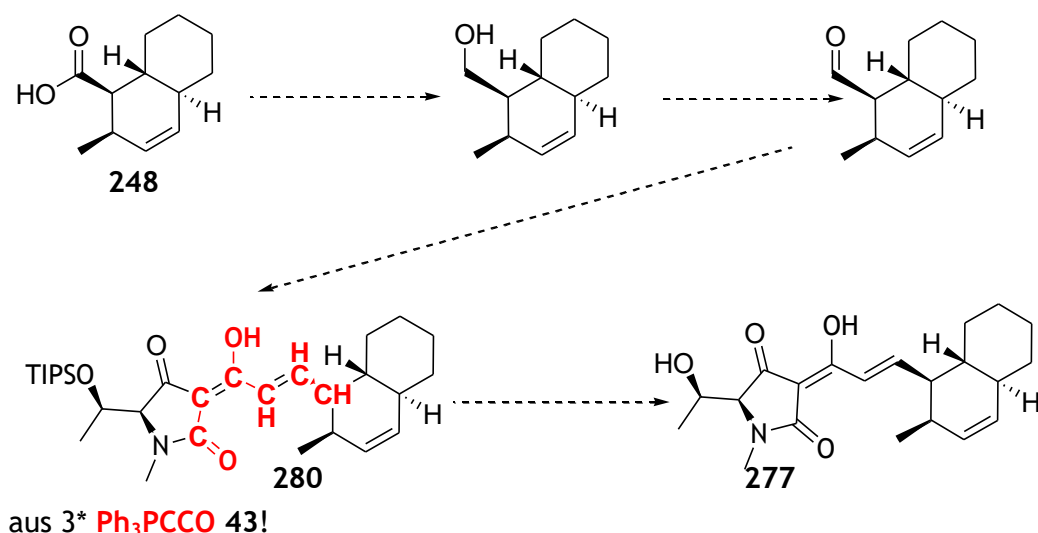


Abb. 128: geplante Synthese des Zopfiellamid- Analogons **277**

An diesem Punkt meiner Syntheseplanungen schickte mir Herr Schobert eine neue Veröffentlichung²⁰, in welcher der oben schon erwähnte neu entdeckte Naturstoff Spiroscytalin **28** beschrieben wurde. Da aus unserer Synthese zu TA-289 **136** noch genug Dioxolan vom Decadienal **281** vorhanden war, wollte ich zum Schluss noch die folgende von mir geplante Synthese ausprobieren (Abb.129).

Die als Testsystem zur Untersuchung der Zyklisierung nötige Tetramsäure **282** habe ich bereits hergestellt. Für die Synthese des Naturstoffes muss man dann allerdings von D-Phenylalanin ausgehen. Wichtig zu untersuchen wird sein, wie man die Michael- Addition von **282** an **284** unterdrücken kann⁸². Ein Ansatz wäre die portionsweise Zugabe von **282** zur Reaktionslösung, die eine geeignete Lewisäure enthält, welche eliminiertes **284** direkt intramolekular zyklisiert, bevor es intermolekular von **282** angegriffen werden kann. Die Stereochemie der Doppelbindung ließe sich möglicherweise durch unterschiedliche Wahl der Lewis- Säure beeinflussen. Eine weitere wichtige Rolle dabei spielt der Einsatz von **282** in N-Boc-, N-H-, oder N-PMB- Form, was die Reaktivität und die Komplexeierungseigenschaften verändert. Besonders reizvoll für den Synthetiker ist die Möglichkeit aus den einfachen

Edukten **285** und **282** in einer Reaktionskaskade aus Addition, Eliminierung und IMDA einen Naturstoff im Eintopfverfahren herzustellen.

Nach der Erprobung der richtigen Reaktionsbedingungen, kann eine selektive Induktion der korrekten Stereochemie neben dem optisch reinen Phenylalaninsubstrat durch die vorher enantioselektiv installierte α -Methylgruppe im Aldehyd **285** erfolgen.

Unter stark sauren Bedingungen eliminieren die Additionsprodukte aromatischer Aldehyde direkt zum konjugierten π -System⁸². 3-lithiierte O-Alkyltetramate addieren ohne Eliminierung und damit ohne Dimerisierung auch aliphatische und ungesättigte Aldehyde zu chromatographierbaren Alkoholen⁸³. Allerdings habe ich festgestellt, dass das C-5 besonders der Phenylalanin- abgeleiteten Tetramsäure zur Racemisierung neigt. Man sollte daher zunächst auf den Einsatz von BuLi verzichten.

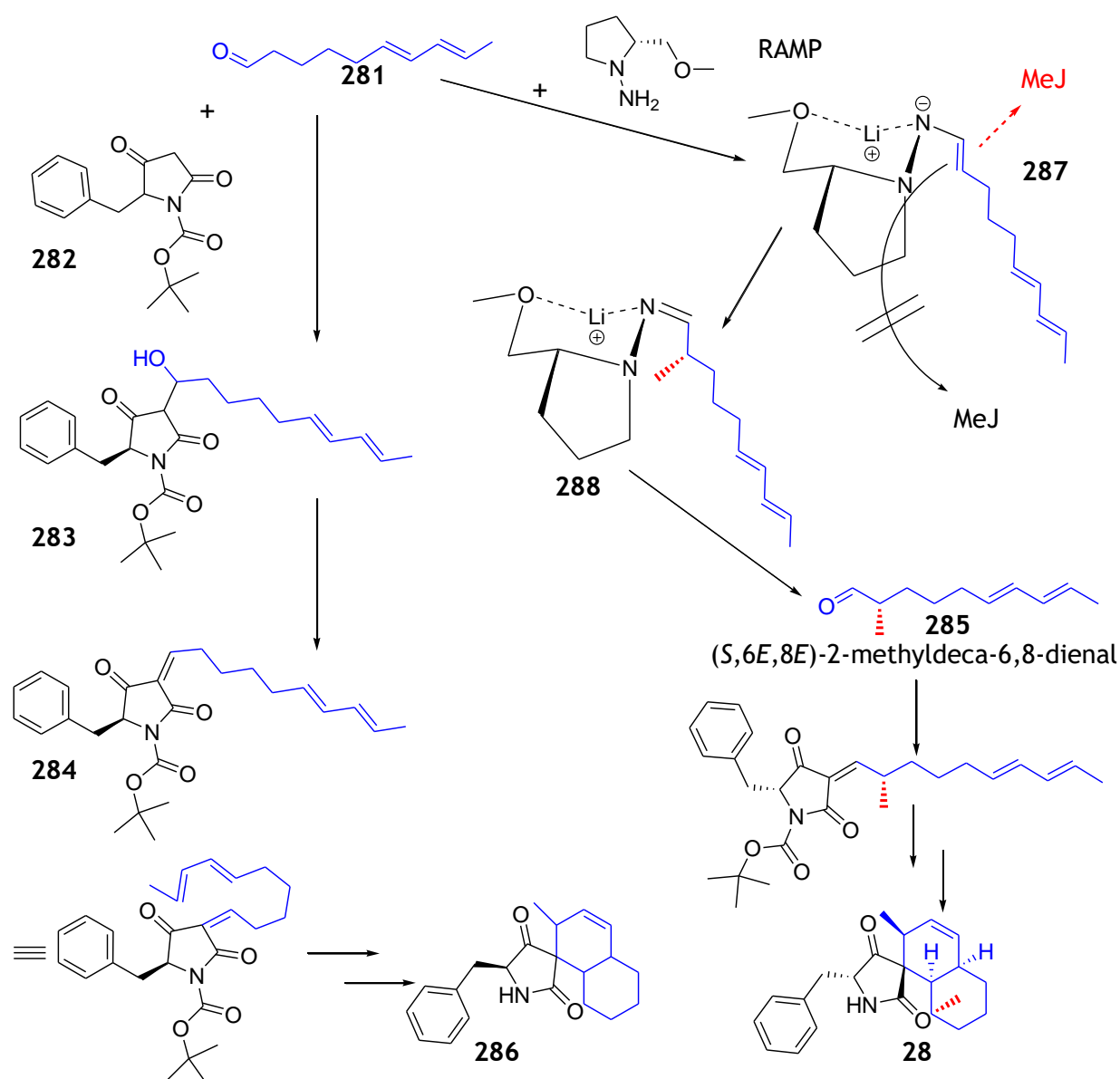


Abb. 129: geplante Synthese für Nor- Spiroscytalin **286** und Spiroscytalin **28**

In einem ersten Versuch wurden **281** und **282** in verschiedenen Solventien vorgelegt und zwei Äquivalente Lewissäure hinzugegeben (Tabelle 10).

*Tabelle 10: erste Versuche zur Darstellung von Nor- Spiroscytalin **286***

Lewis- Säure	LM	Ergebnis
Me ₂ AlCl	THF	SiO ₂ -Chromatographie ergibt zwei Fraktionen, die Produkt nicht enthalten
ZnCl ₂	THF	DC zeigt kein eindeutig chromatographierbares Produkt
BÄt ₃	THF	DC zeigt kein chromatographierbares Produkt
MgBr ₂ *OÄt ₂	THF	DC zeigt kein chromatographierbares Produkt
MgBr ₂ *OÄt ₂	DCM	Nach Zugabe von MgBr ₂ entsteht eine tiefblaue Färbung, die sich erst bei der Zugabe von Wasser über bräunlich entfärbt, was auf die Bildung eines stabilisierten Radikales hindeutet; SiO ₂ -Chromatographie ergibt zwei Fraktionen, die Produkt nicht enthalten

Ohne jeden der obigen Testansätze chromatographiert zu haben, konnte man auf dem DC sehen, dass keine einheitlichen Produkte entstanden waren. Das heißt aber nur, dass die mögliche oben angesprochene Reaktionskaskade unter diesen Bedingungen nicht abläuft, was nach dem „ersten Schuss“ ganz normal ist. Der erste Schritt ist nämlich die Addition, welche bisher nur unter extrem sauren⁸² oder basischen⁸³ Bedingungen beschrieben wurde. Also setzt hier wieder die systematische Analyse der Teilschritte ein.

Um zunächst sicherzustellen, dass die Knoevenagel- Reaktion tatsächlich startet, habe ich zusammen mit meiner Frau Oxana nocheinmal die Testreaktion mit **281** und **282** unter sieben verschiedenen Bedingungen (Tabelle 11) ohne anfängliche Zugabe von Lewissäure angesetzt. Als Base sowie möglicher Organokatalysator wurde Piperidin⁶¹ (als Standard) und Prolin⁸⁴ (Versuch 4) verwendet. Für den Fall, dass die Schiff'sche Base aus **281** sofort in einer intramolekularen Hetero- Diels- Alder- Reaktion zyklisieren sollte, wurde einmal Pyridin angewendet (Versuch 5). Um die Tetramsäure vollständig zu deprotonieren, wurde die Base einmal überstöchiometrisch eingesetzt (Versuch 1). Um den Einfluss des Lösungsmittels zu untersuchen, wurde neben Chloroform (als Standard) auch THF (Versuch 3) und Methanol (Versuch 4) verwendet. Da zunächst nur der Nachweis der Entstehung des Produktes **286** im Vordergrund stand und nicht die Stereoselektivität, wurden die Ansätze 1, 4 und 7 ohne Zugabe von Lewissäure einer thermischen Zyklisierung durch 30 minütiges Erhitzen auf 60°C unterworfen. Als alternative Lewissäure zu Me₂AlCl (als Standard je 0,3 Äq.) wurde ZnCl₂ eingesetzt (Versuch 6).

Tabelle 11: zweite Versuchsreihe zur Darstellung von Nor- Spiroscytalin **286**, Besonderheit des jeweiligen Versuches in rot

Ansatz	Lösungsmittel	Äquivalente Base	0,3 Äq. Lewisäure
1	CHCl ₃	1,2 Piperidin	--
2	CHCl ₃	0,3 Piperidin	Me ₂ AlCl
3	THF	0,3 Piperidin	Me ₂ AlCl
4	MeOH	0,2 Prolin	--
5	CHCl ₃	0,3 Pyridin	Me ₂ AlCl
6	CHCl ₃	0,3 Piperidin	ZnCl ₂
7	CHCl ₃	0,3 Piperidin	--

Um sicherzustellen, dass die Knoevenagel- Reaktion abgelaufen ist, wurden **281** und **282** unter Basenkatalyse zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Erst danach wurden die Lewis- Säuren zugegeben, beziehungsweise die Reaktionslösungen erhitzt. Die dünnschichtchromatographische Analyse der Reaktionen (Abb. 130) zeigt einerseits, dass überall dasselbe Muster zu sehen ist. Andererseits veränderte sich dieses im Vergleich vor und nach Lewis- Säure- Zugabe/ Erhitzen nicht signifikant, woraus man schließen kann, dass die intramolekulare Diels- Alder- Reaktion bereits bei Raumtemperatur abläuft. Allerdings liegen vorher noch deutlich größere Mengen der polareren Fraktionen vor, wobei es sich zum Beispiel um das formale „Aldol- Additionsprodukt“ aus Tetramsäure und Aldehyd handeln könnte.

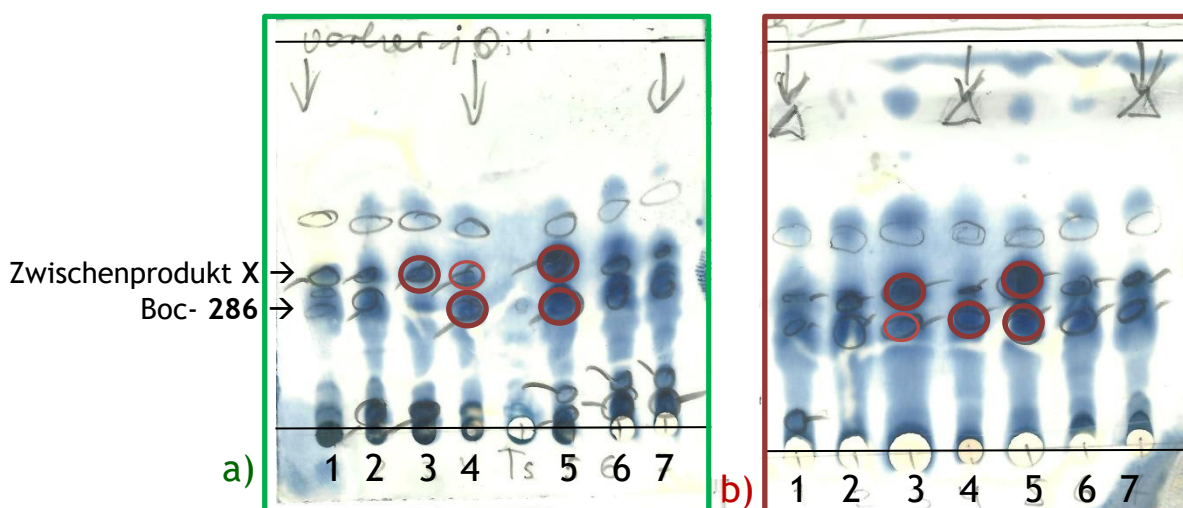


Abb. 130: dünnschichtchromatographische Analyse der zweiten Versuchsreihe zur Darstellung von Nor- Spiroscytalin **286** (Färbung mit schwefelsaurer Molybdophosphorsäure/ Cer(II)-Sulfat); a) vor und b) nach Lewis- Säure- Zugabe/ Erhitzen (mit ↓ markiert sind die drei erhitzten Reaktionen)

Positiv fällt auf, dass die Produktfraktion bei Versuch 5 deutlich dicker ist, was daher rühren könnte, dass Pyridin günstiger ist, weil es keine Schiff'sche Base bildet. Auf Spur 1 ist die

entsprechende Fraktion etwas dünner, weshalb ein überstöchiometrischer Einsatz der Base unnötig ist.

Interessanterweise sind überall zwei ähnlich große Hauptfraktionen gleicher Färbung erkennbar- mit Ausnahme der Versuche 3 und 4, bei denen die obere beziehungsweise die untere Partition überwiegt. Bereits nach der wässrigen Aufarbeitung und bei der säulenchromatographischen Aufreinigung war nur noch eine Hauptfraktionen erkennbar. Da Methanol als das einzige getestete protische Solvens bereits während der Reaktion zur unteren Hauptfraktion führt, könnte es sich bei der oberen um eine unter protischen Bedingungen instabile Zwischenverbindung X (Abb. 130, 131) handeln. Dafür spricht auch, dass **zunächst bei 4 a) noch erkennbar die obere Fraktion** vorliegt und **später bei 3 b) schon die untere**. Das verwendete Chloroform war zwar nicht mit Ethanol stabilisiert, aber auch nicht über CaH_2 , sondern über Molsieb getrocknet, weshalb es Spuren von HCl enthalten könnte, was das Vorhandensein beider Fraktionen in den Chloroform- Ansätzen erklären würde. Zur Identifizierung dieses Zwischenproduktes X wäre eine DC- MS- Analyse nützlich. Die Aufklärung der Struktur von X ist wichtig für ein besseren Verständnis des Mechanismus‘ dieser IMDA- Reaktion und damit zur Kontrolle der Stereoselektivität.

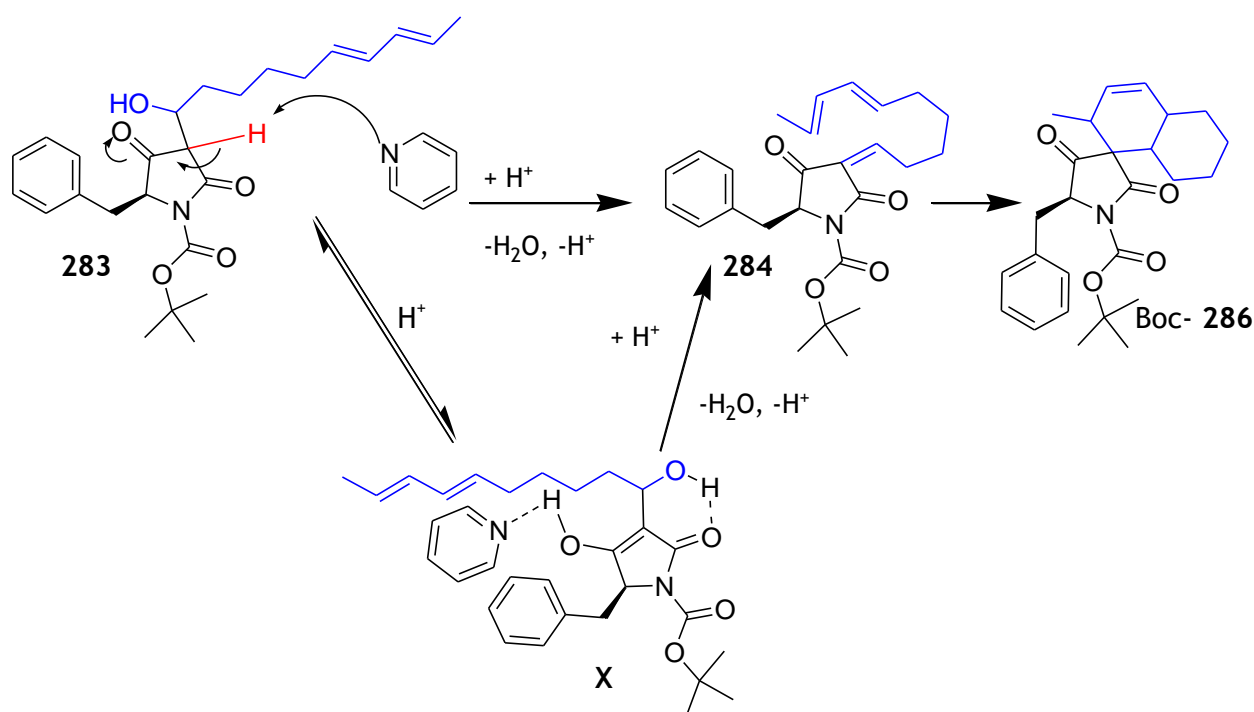


Abb. 131: möglicher Mechanismus der IMDA- Reaktion des Knoevenagel- Produktes **284** über ein Zwischenprodukt X, welches unter protischen Bedingungen zur Spiroverbindung Boc- **286** abreagiert

Beim Nachdenken über den Mechanismus fiel mir auf, dass ich mich die ganze Zeit gefragt hatte, wo denn auf dem DC das primäre Aldol- Additionsprodukt **283** zu finden sei. Formal sollte die Verbindung mit einer zusätzlichen Hydroxyfunktion polarer sein, als das

Endprodukt **Boc- 286**. Also konnte es sich bei X eigentlich nicht um diesen Alkohol handeln. Weiterhin sollte die IMDA allerdings spätestens nach Erhitzen oder Lewis- Säure- Behandlung (das DC nach Reaktion über Nacht im Kühlschrank zeigte keine Veränderung) vollständig abgelaufen sein. Dann fiel mir ein, dass die Annahme einer schnellen basenkatalysierten Eliminierung dieses Alkoholes **283** zunächst davon abhängt, dass Protonen verfügbar sind, denn OH^- ist eine zu schlechte Abgangsgruppe. Im aprotischen Lösungsmittel muss man in Betracht ziehen, dass nach Abstraktion des C-H- aciden Protons (in Abb. 131 rot hervorgehoben) von **283** die Eliminierung womöglich nicht die favorisierte Folgereaktion ist. Letztere erfordert einen Bruch der C-O- Einfachbindung, wohingegen die in Abb. 131 dargestellte Enolisierung zu Zwischenprodukt X leicht ablaufen kann. Damit wird klar, dass sich der signifikante Unterschied der Reaktionsgeschwindigkeit (Spuren 3, 4; Abb. 130) auch in der bekanntermaßen unterschiedlichen Keto- Enol- Verteilung von **283** in Abhängigkeit der Polarität des Lösungsmittels begründen kann. Im apolaren Chloroform liegen Tetramsäuren zum großen Teil in der Diketoform¹ vor, wohingegen im polaren THF die Enolform² überwiegt. Letztere enthält eben das C-H- acide Proton nicht mehr und verzögert so die Eliminierung zu Zwischenprodukt X.

Der ungewöhnliche Polaritätsunterschied zwischen X und **Boc-286** lässt sich durch folgende Faktoren erklären:

- Die lange Kohlenwasserstoffkette führt ohnehin zu einem stark apolaren Anteil.
- Die Polarität des besagten Alkoholes wird durch die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke reduziert.
- Die stark „kugelige“ Form der Spiroverbindung führt zu einer erhöhten Polarität im Gegensatz zu „planaren“ Decalinoyltetramsäuren.
- Möglicherweise findet auch eine π - π - π - Stapelwechselwirkung statt, mit welcher sich das Pyridin zwischen Phenyl- und Dienoylrest „hineinschiebt“ und gleichzeitig den Enol stabilisiert.

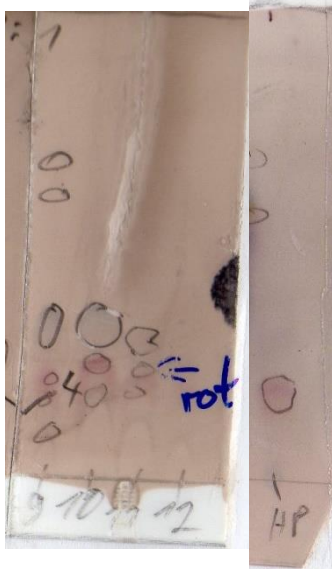


Abb. 132: Gut auf dem DC zu identifizieren ist **286** durch eine charakteristische Purpurfärbung mit methanolischer schwefelsauren Anisaldehyd- Vanillin- Lösung (Kyklohexan- EE 5:1). Links: Fraktionen der Säulenchromatographie inklusive blau gefärbter Nebenprodukte; rechts: Reinprodukt nach HPLC

Anhand obiger Überlegungen kann man nun versuchen, Einfluss auf die Stereoselektivität dieser Reaktionssequenz zu nehmen.

1. Verhindert man die Eliminierung zu **284** möglichst effektiv, so gibt man **283** die Gelegenheit zur Einstellung des Keto- Enol- und Konformationsgleichgewichtes. Dies kann offenbar durch Verwendung eines polar- aprotischen Lösungsmittels wie THF (siehe Abb. 130 Spur 3) erreicht werden. Ebenso sollten auch beispielsweise DMSO oder Dioxan getestet werden.
2. Wählt man zusätzlich das Lösungsmittel und die Base dermaßen, dass dieses Gleichgewicht fast ausschließlich auf einer Seite liegt, kann man damit wahrscheinlich die Geometrie der Doppelbindung in **284** festlegen
3. Erst dann werden Protonen angeboten, welche die Eliminierung einleiten.
4. Die IMDA- Zyklisierung verläuft dann wahrscheinlich schon bei Raumtemperatur thermisch ab.
5. Will man diese Zyklisierung auch noch beeinflussen, stellt sich die Frage, ob es möglich ist, zuerst Protonen für die Eliminierung bereitzustellen, ohne die Lewisäuren zu inaktivieren. Dies könnte man erreichen, indem die protische Spezies als möglichst schlechter Ligand das entsprechende Metall nicht koordiniert, oder nur koordiniert, ohne zu inaktivieren.

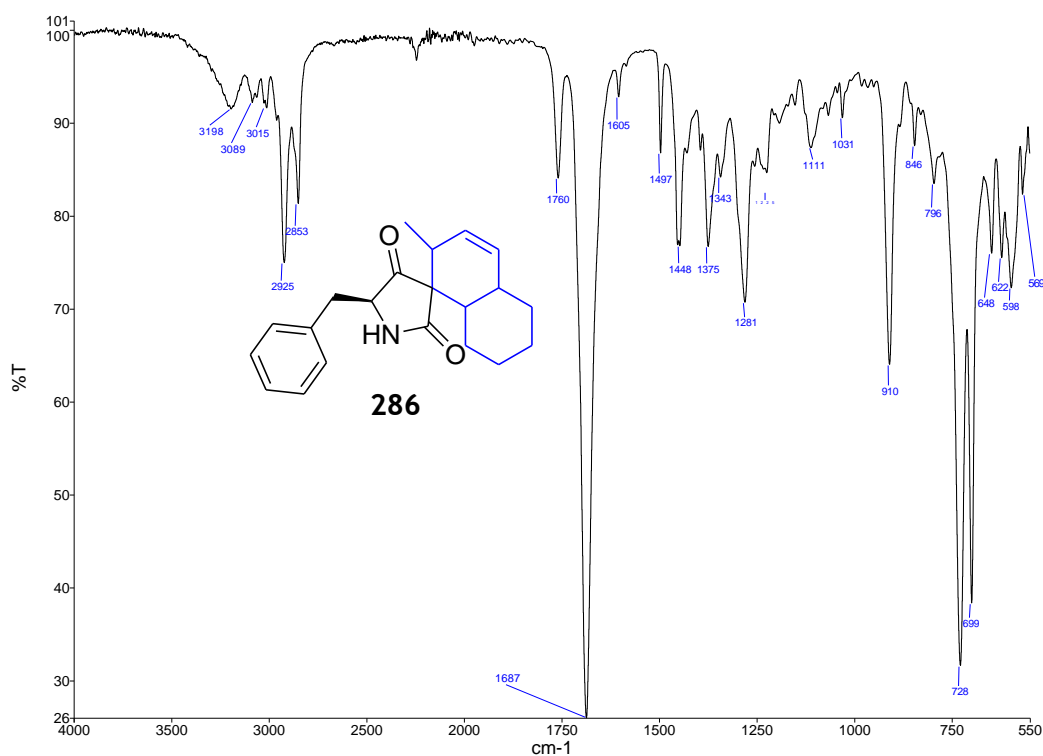


Abb. 133 a): IR- Spektrum von **286**

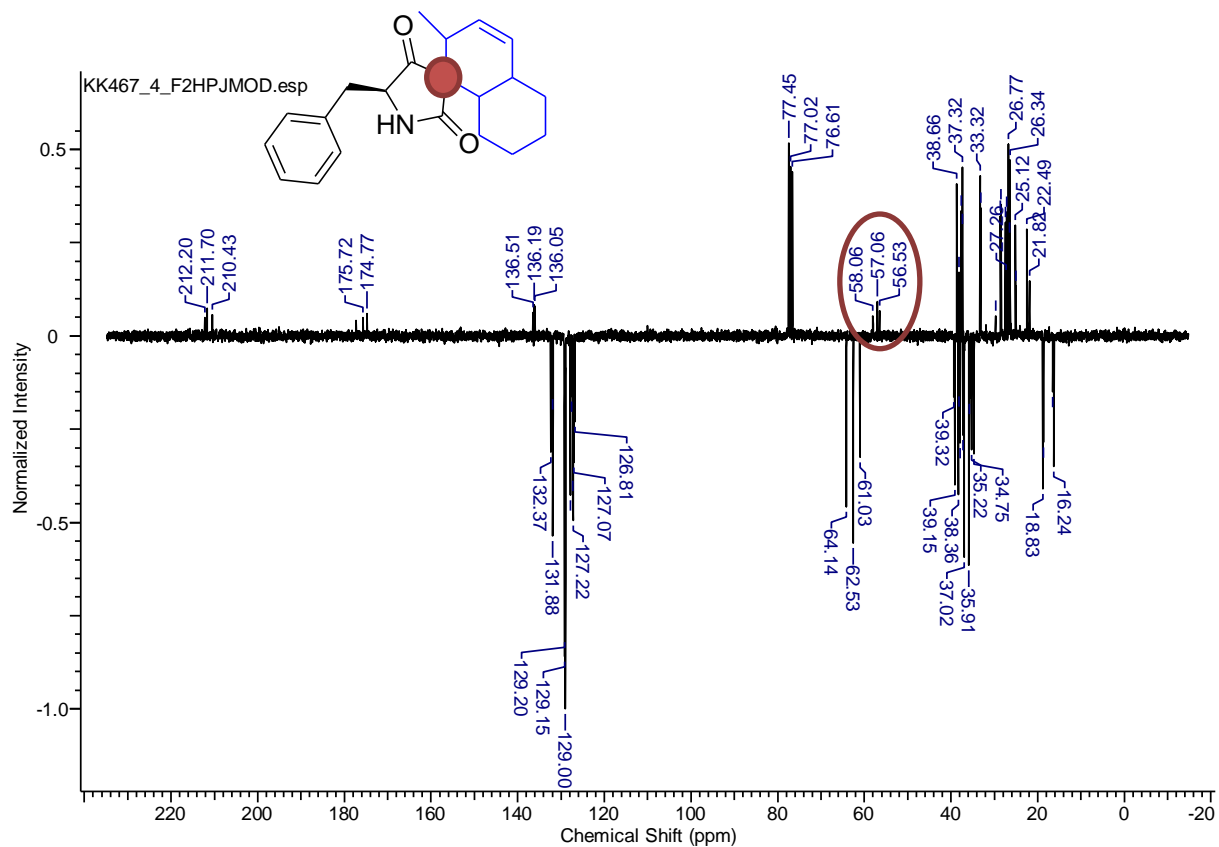
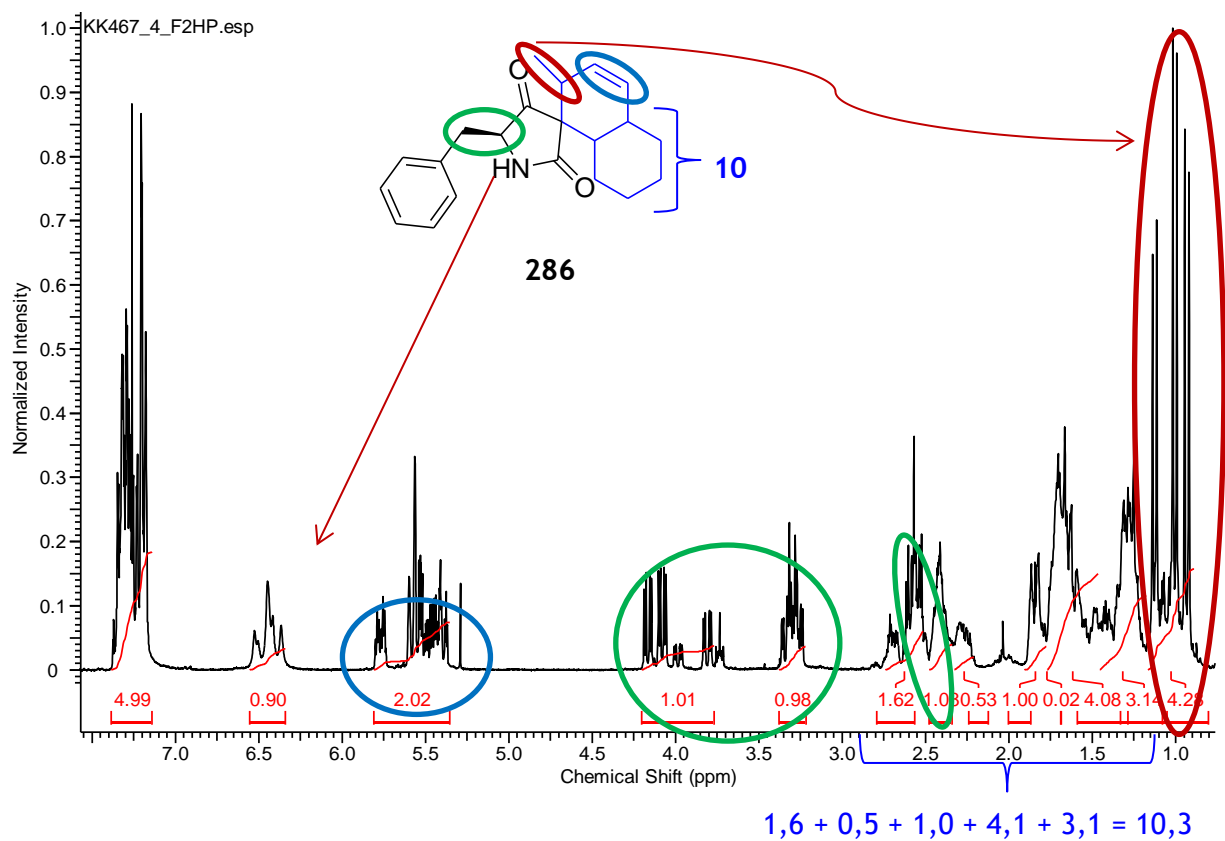


Abb. 133 b): ^1H - und ^{13}C - NMR- Spektrum von **286** als eine Mischung von drei Haupt- und zwei Nebenisomeren (man beachte die exakte Übereinstimmung der Integrale im ^1H - NMR- Spektrum)

Die Isolierung der Hauptfraktion von Versuch 7 bestätigt in NMR, HRMS (für $C_{26}H_{33}NO_4Na^+$ berechnet: 446,2302; gefunden: 446,2301) und IR die Entstehung vom gewünschten Produkt des noch Boc- geschützten Analoges zu **286** in 40% Ausbeute. Auch aus Reaktion 5 wurde dieses Produkt erhalten, weil die katalytische Menge Lewis- Säure- nicht zur Boc- Entschützung führt. Um die Schutzgruppe quantitativ abzuspalten, wurden die gereinigten Produkte von 5 und 7, sowie die Rohprodukte von 3 und 4 mit 20% TFA in DCM 30min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Säulenchromatographie konnte aus den ersteren beiden kein Produkt isoliert werden, wohingegen die Produktfraktionen von 3 und 4 laut analytischer HPLC das gleiche Produkt **286** als Diastereomerenmischung enthielten. Das könnte daran liegen, dass im Rohprodukt vorhandene basische Substanzen eine Pufferwirkung ausüben und es bei der Entschützung der chromatographierten Produkte zur Zersetzung gekommen ist. Aus Reaktion 4 war mit einer Ausbeute von 48% etwa doppelt so viel Substanz entstanden, wie aus Reaktion 3. Sowohl HRMS (für $C_{21}H_{26}NO_2^+$ berechnet: 324,1958; gefunden: 324,1942), als auch IR- und NMR- Spektroskopie (Abb.133) beweisen die erfolgreiche Durchführung der gewünschten Knoevenagel -IMDA- Dominoreaktion.

Nach diesen vielversprechenden Vorversuchen stand als nächster Schritt die Darstellung des α - methylierten Decadienals an. Natürlich ist die Verwendung von Methyl- γ - Hydroxybuttersäure⁸⁵ als Edukt für die Bromierung und anschließende Cupratkupplung mit Sorbinacetat wesentlich billiger und atomökonomischer, aber im Moment ging eben die Methylierung des RAMP- Hydrazones **287** des vorhandenen Decadienales schneller. Das nach Standardvorschrift⁸⁶ in guten Ausbeuten erhaltene diastereomerenreine Hydrazon **288** (Abb. 134) konnte wegen der vorhandenen Doppelbindungen leider nicht ozonolytisch gespalten werden, wodurch nach Methylierung und Hydrolyse⁸⁷ das Auxiliar nicht rückgewonnen werden kann und auch die Ausbeute der Entschützung nur mager (50 %) war.

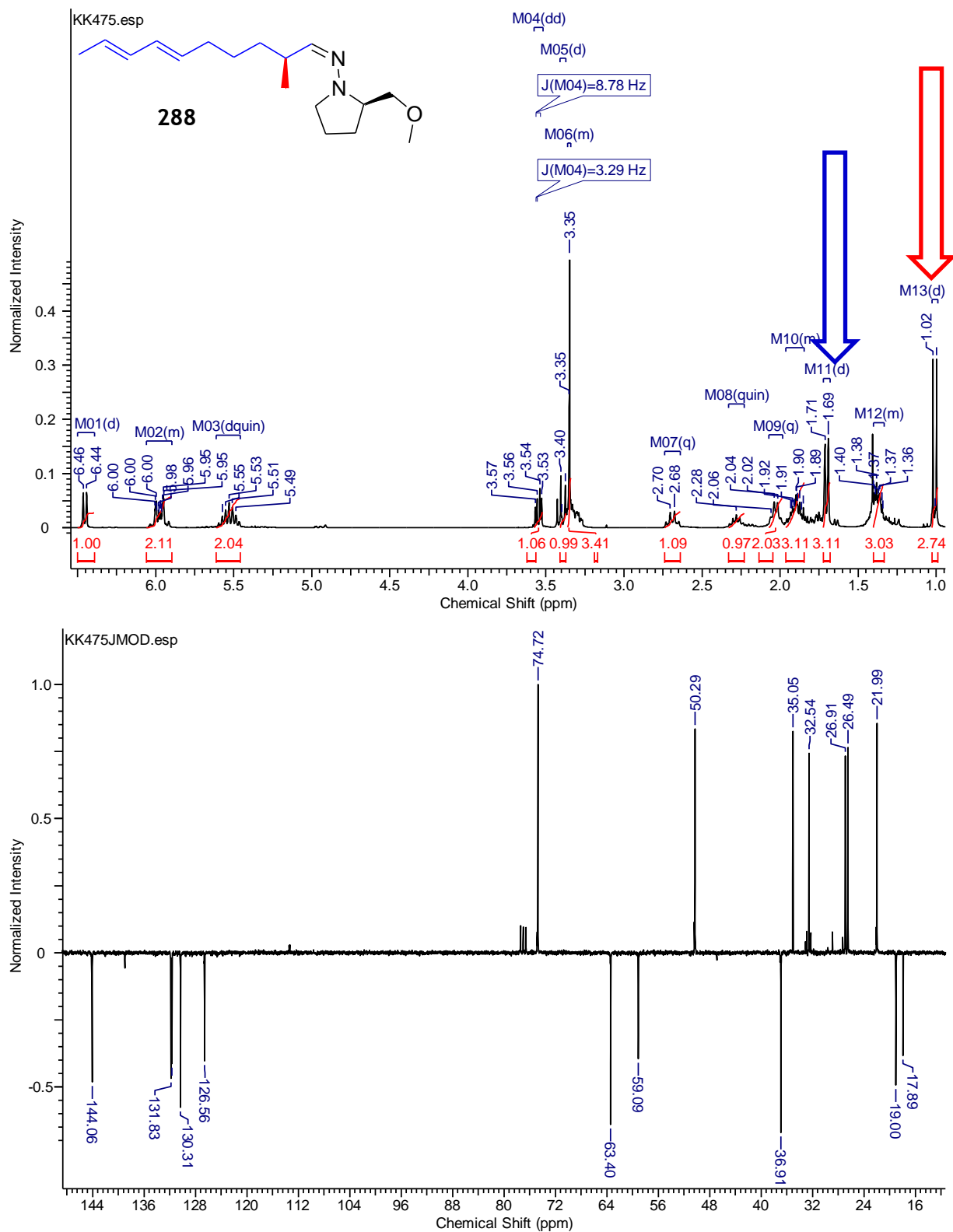


Abb. 134: ¹H- und ¹³C- NMR- Spektrum von **288**

Mit dem so gewonnenen enantiomerenreinen Aldehyd **285** wurden anschließend die in Tabelle 12 dargestellten Versuche zur Darstellung des Naturstoffes **28** durchgeführt.

Dazu wurde nun einerseits die vom D- Phenylalanin abgeleitete Tetramsäure **282** verwendet; andererseits wurde als Vergleichprobe für die spätere ^{13}C - NMR- Analyse der Diastereomeren auch deren Enantiomer eingesetzt (Versuch C) und zur Untersuchung des Einflusses der Schutzgruppe von **282** vorher die Boc- Gruppe entfernt (Versuch D). Nach wässriger Aufarbeitung am 24. 12. 2016 warten die Rohprodukte nun auf ihre Gelegenheit zur Boc- Entschützung und Chromatographie nach Wiedereinschaltung des Kühlwassersystemes an der Universität im Januar.

*Tabelle 11: erste Versuchsreihe zur Darstellung von Spiroscytalin **28**, Besonderheit des jeweiligen Versuches in rot*

Versuch	Lösungsmittel	Katalysator	Lewissäure	Tetramsäure 282
A	CHCl_3	Pyridin	Me_2AlCl	D- N-Boc
B	MeOH	Prolin	--	D- N-Boc
C	CH_2Cl_2	Pyridin	Me_2AlCl	L- N-Boc
D	CHCl_3	Pyridin	Me_2AlCl	D- N-H
E	CHCl_3	Pyridin	ZnCl_2	D- N-Boc

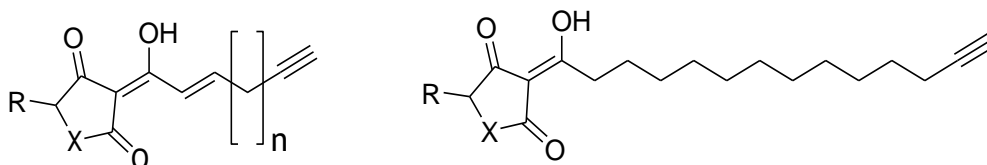
Seien Sie gespannt auf die Präsentation der neuesten Ergebnisse in der Doktorprüfung!

7. Zusammenfassung

7.1 auf Deutsch

Das Thema dieser Dissertation „**Synthese von 3-Acyltetramsäurederivaten und deren Markierung zur Visualisierung in Zellen**“ wurde in drei eigenständigen Aufgabenblöcken bearbeitet. Diese bestanden in der Funktionalisierung zur Markierung, der Acylierung mit Ketenylidentriphenylphosphoran 43 und der Naturstoffsynthese.

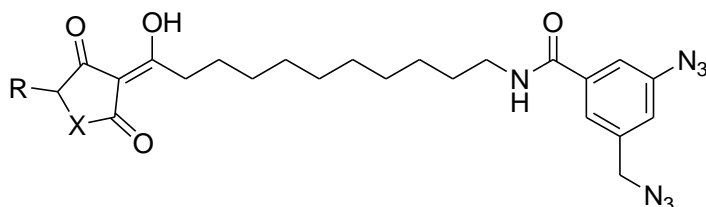
Die Funktionalisierung wurde zunächst über eine endständige Aminogruppe versucht, was sich aber aufgrund der hohen Polarität und zwitterionischen Eigenschaften als unpraktikabel herausstellte. Als zweite Methode wurden über leicht handhabbare Intermediate in hervorragenden Ausbeuten alkinterminierte Seitenketten synthetisiert. Durch Acylierung an verschiedene Heterozyklen wurden so zahlreiche Derivate dargestellt, welche nach *in situ* Klick- Markierung spezifische Verteilung in eukaryontischen Zellen mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen zeigten.



R= H, Me, PhCH₂, *sec*Butyl, CH₃CH(OH); X= NMe, NH, S; n= 4, 5, 11

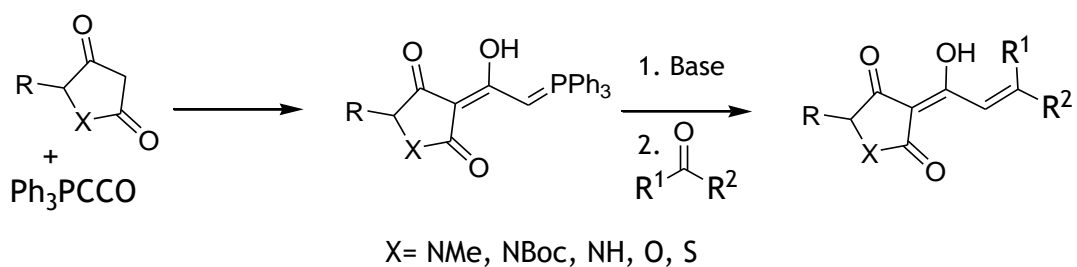
Auch Versuche zur Koloalisation wurden von einem Kollegen bereits durchgeführt, wobei sich aber noch keine eindeutigen Ergebnisse zeigten.

Als dritte Methode habe ich eine problemlose Synthese zur Einführung einer Bisazidfunktion etabliert, wodurch neben Koloalisation der markierten Verbindungen auch die Isolierung und Identifizierung der Zielproteine, ja sogar der genauen Bindungsstelle im Protein⁴⁸ ermöglicht werden kann.

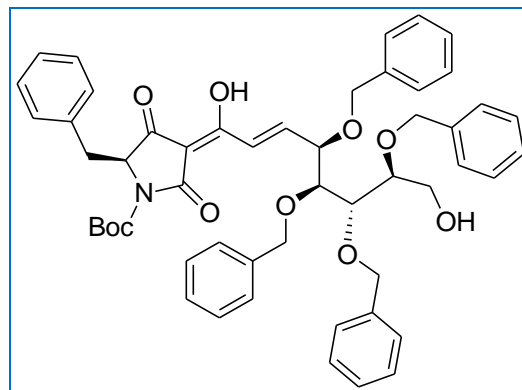
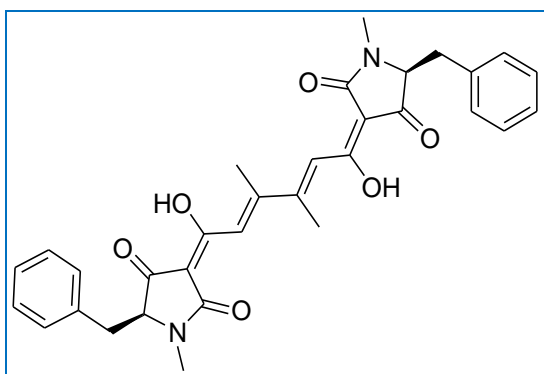
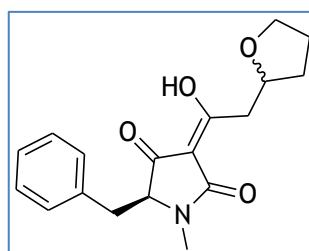
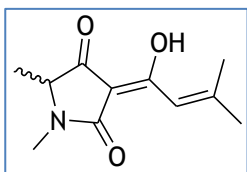


a) R= Me, X = NMe; b) R= CH₃CH(OH), X = NMe; c) R= PhCH₂, X= NH

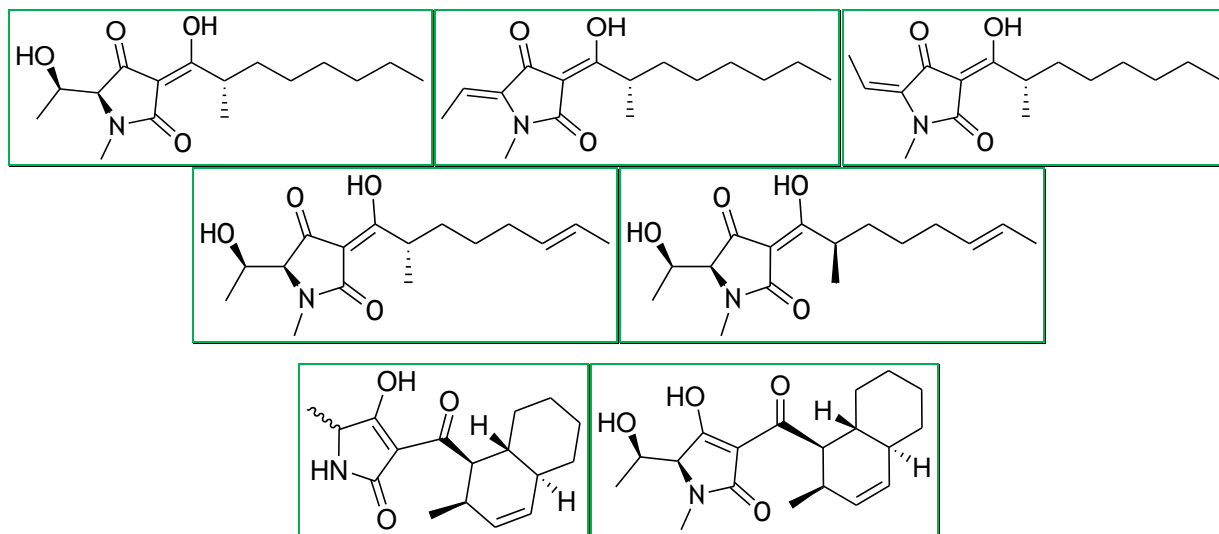
Die Acylierung von Tetram- und Thiotetronsäuren mit Ketenylidetriphenylphosphoran habe ich zusammen mit Andrea Schlenk etabliert.



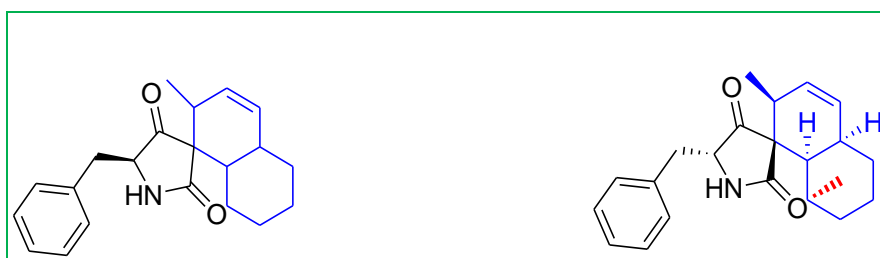
Desweiteren habe ich verschiedene Bedingungen für die Wittig- Reaktion der entstandenen Ylide untersucht und letztere mit unterschiedlichen Oxo- Komponenten zu den folgenden 3-Acyltetramsäurederivaten umgesetzt.



Ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit habe ich als natürliche 3-Acyltetramsäuren die Threonin- abgeleiteten **Penicillenole A₁, B₁, B₂, C₁** und dessen Diastereomer, sowie die Octalinoylderivate **TA-289** und allo- **Methiosetin** synthetisiert.



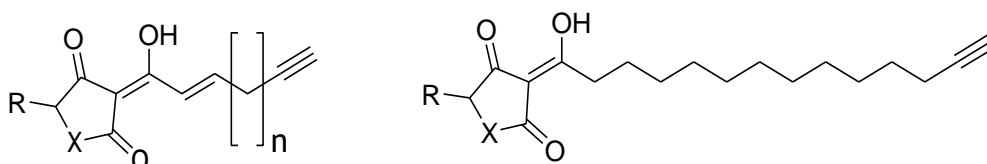
Zuguterletzt habe ich noch wichtige Vorarbeiten für die Synthese von **Spiroscytalin** geleistet, wobei bereits über HRMS und NMR bewiesen wurde, dass die von mir entwickelte Domino- Knoevenagel- IMDA- Reaktion mit nachfolgender Boc- Entschützung in rund 50% Ausbeute zum gewünschten **Nor- Spiroscytalin** (als Diastereomenrenmischung) führt. Die stereoselektive α - Methylierung des Decadienales wurde ebenso wie die Folgereaktion zum Naturstoff bereits durchgeführt. Die Identifizierung der entstandenen Diastereomere inklusive des Naturstoffes habe ich direkt im Anschluß an die Promotionsprüfung erfolgreich veröffentlicht.



7.2 Summary in English

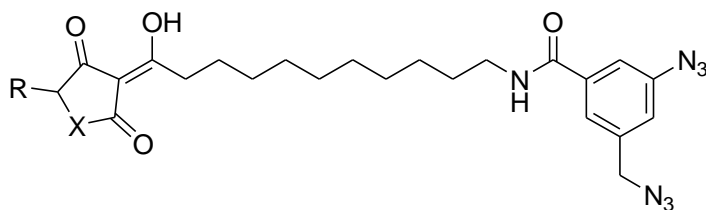
The subject of this thesis "Synthesis of 3-acyl-tetramic acid derivatives and their labeling for visualization in cells" was edited in three separate task blocks. These consisted in functionalizing for labeling, the acylation with ketylenetriphenylphosphorane and natural product synthesis.

The functionalization was first tried with a terminal amino group, but due to the high polarity and zwitterionic properties this turned out to be impractical. As a second method acetylene terminated side chains were synthesized via easy-to-handle intermediates in excellent yields. Acylation to various heterocycles afforded numerous derivatives, which showed specific distributions in eukaryotic cells by fluorescence microscopy after *in situ* click-labeling. Attempts for colocalization have been carried out by a colleague, but did not show clear results so far.



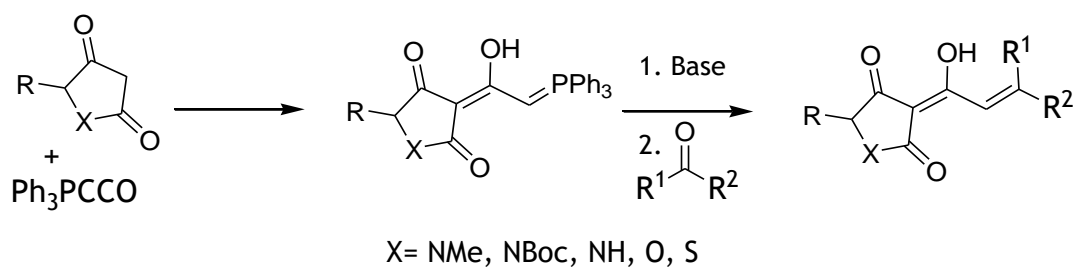
R= H, Me, PhCH₂, *sec*Butyl, CH₃CH(OH); X= NMe, NH, S; n= 4, 5, 11

As a third method, I have established a smooth synthesis incorporating a bisazide function which, besides colocalization of labeled compounds, should allow the isolation and identification of target proteins, even the exact binding site in the protein.

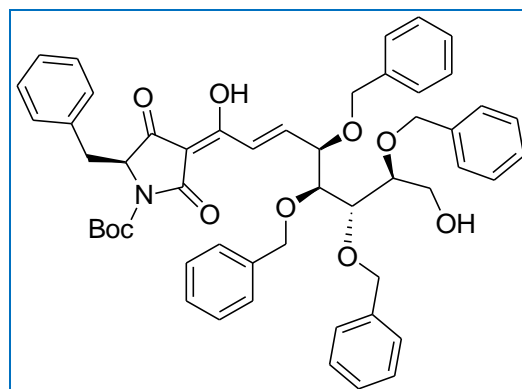
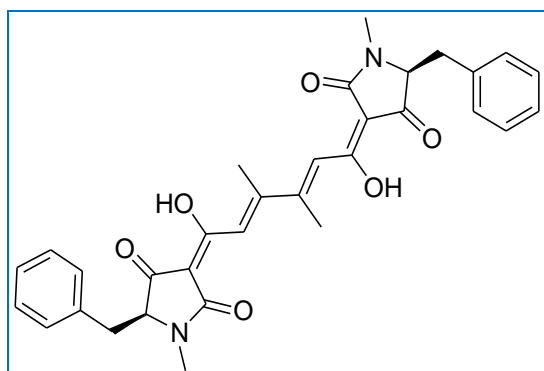
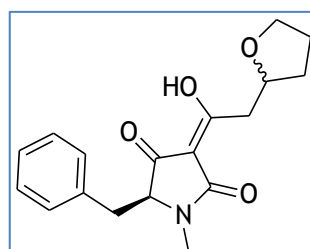
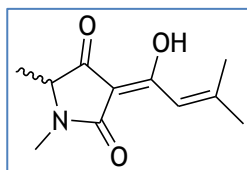


a) R= Me, X = NMe; b) R= CH₃CH(OH), X = NMe; c) R= PhCH₂, X= NH

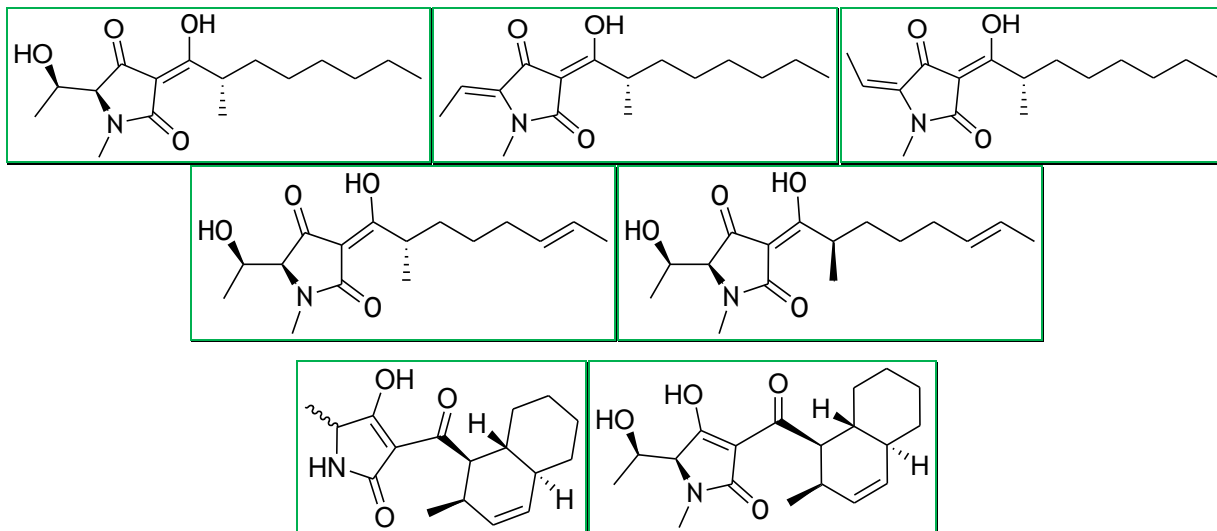
I have established the acylation of tetramic, tetronic and thiotetronic acids with ketenylidenetriphenylphosphorane together with Andrea Schlenk.



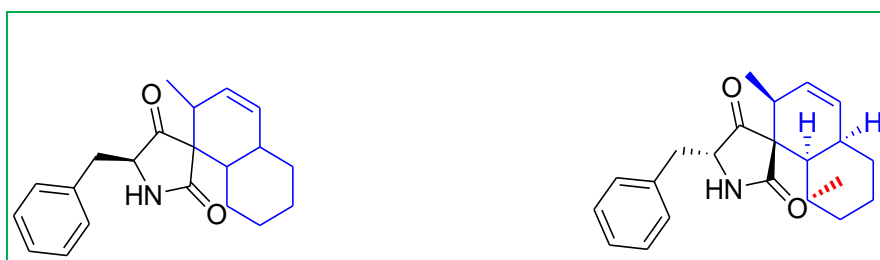
Furthermore, I have studied a number of different conditions for the Wittig reaction of the resulting ylides and reacted the latter with various oxo components to furnish among others the following 3-acyl-tetramic acid derivatives.



Also in the present work, I have synthesized as natural 3-acyl tetramic acids the threonine-derived **Penicillenols A₁, B₁, B₂, C₁** and its diastereomer as well as the octalinoyl derivatives **TA-289** and **allo- Methiosetin**.



Last but not least, I have done important preliminary work for the synthesis of **Spiroscytalin**, where I already proved by means of HRMS and NMR that the Domino-Knoevenagel-IMDA reaction developed by me leads with subsequent Boc deprotection in about 50% yield to the desired **Nor-Spiroscytalin** (as diastereomeric mixture). The stereoselective α -methylation of the decadienal was carried out as well as the following reaction to the natural compound. The identification of the latter and successful publication were accomplished directly after completing the present thesis.



8. Dankerbietung

Zuerst möchte ich mich bei **meinen Eltern** bedanken, die mich soweit mit Einkäufen, Behördengängen, Essen zubereiten, Häuser putzen, Geld, Urlaubsreisen u.v.a.m. unterstützt haben, sodass ich meine volle Konzentration auf meine Arbeit richten konnte. Ebenso bedanke ich mich bei meiner **lieben Frau Oxana**, für ihre Geduld und moralische sowie physische Unterstützung. Außerdem hat sie ebenfalls mit Geld, Einkäufen, leckerem Essen, Massagen und großer Hilfe im Labor zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Meinem **Onkel Dr. Ullrich Dietz** danke ich für die zur Verfügungstellung seines Hauses in Bayreuth und medizinische Versorgung.

Bei meinem Betreuer **Herrn Professor Schobert** bedanke ich mich einerseits für die gute Betreuung. Dazu gehört, dass ich sehr oft deprimiert und beschämt in Einzelbesprechungen hineinging, weil ich das Gefühl hatte, nichts hätte funktioniert; heraus kam ich aber voll mit neuer Motivation und frischen Ideen, weil Herr Schobert stets das Positive an meinen Versuchen erkannte und nur konstruktive Kritik äußerte. Andererseits bin ich Herrn Schobert sehr dankbar für die liberale Einstellung gegenüber Arbeitszeiten und äußerer Form des Arbeitsplatzes, was mir erlaubt hat, meiner Kreativität freien Lauf zu lassen. Weiterhin hatte er dankenswerterweise immer ein offenes Ohr für spontane Probleme; so konnte ich jederzeit von Erfahrung und Ratschlägen profitieren. Nicht zuletzt danke ich ihm, dass er mein Labor auch für die Zusammenarbeit mit **Frau Dr. Elisa Bombarda** zur Verfügung gestellt hat, der ich auch dankbar bin, weil sie Oxana zu mir geführt und immer so gut dotierte Verträge herausgesucht hat.

Insbesondere bedanke ich mich bei meinem Laborkollegen **Dr. Sebastian Loscher** für die jahrelange reibungslose Zusammenarbeit und angenehme Laboratmosphäre. Unserem Kollegen **Matthias Göhl** danken wir für die Überlassung großer Mengen sauberer Decalinderivate.

Für die Messung hunderter NMR- Proben bedanke ich mich bei **Kerstin Hannemann**. Für Beratung rund um Analytik und die Messung vieler Massenspektren danke ich **Frau Dr. Lacher**.

Bei **Dr. Katharina Mahal** und **Philipp Kahlen** bedanke ich mich für ihre Bereitschaft, mehrere Samstage für die ersten Photomarkierungstests mit den Bisaziden zu opfern.

Nicht weniger danke ich **Herrn Dr. Florenz Sasse** und **Frau Professor Bilitewski** vom HZI Braunschweig für biologische Tests.

Zuletzt, aber nicht weniger herzlich, bedanke ich mich bei **André Wetzel**, der mir und Oxana für die letzten Monate noch „Laborobdach“ gewährte und in dieser Zeit sehr nett und hilfsbereit mit uns zusammengearbeitet hat.

8 Gründe, weshalb ich 8 Jahre mit meiner Doktorarbeit verbr8 habe:

1. Mein Hauptziel war schon immer, neue Verbindungen zu synthetisieren, die vorher noch niemand hergestellt hatte.
2. Ich hatte das Glück, für Herrn Schobert zu arbeiten, der einerseits mit neuen Ideen inspirierte und jederzeit mit Motivation und Ratschlägen weiterhalf, andererseits mir aber soweit freie Hand ließ, das ich mir meine Zeit einteilen konnte, um möglichst effizient zu arbeiten.
3. Meine liebe Frau arbeitete mit mir im selben Labor.
4. Ich hatte ein herrliches Labor mit weitem Ausblick in die Landschaft bis zum Fichtelgebirge.
5. Mein täglicher Arbeitsweg bestand aus 2* 2,5km über einen schönen Fahrradweg, wobei kein Meter entlang von Autostraßen führte.
6. Die Mensa versorgte uns mit einer großen Auswahl leckerer Gerichte zu günstigen Preisen inclusive großer Salatbar mit außergewöhnlichen Soßen, einer großen Auswahl frisch gepreßter Fruchtsäfte und Obst.
7. Wir hatten (schon dreimal) die Freiheit, nach anstrengender Arbeit 10 Wochen lange erholsame und lehrreiche Reisen durch Europa und USA zu unternehmen.
8. Ich musste befürchten, dass bei einer zukünftigen Arbeit nicht alle diese Pluspunkte erfüllt werden; warum also das Liebgewonnene aufgeben?

Das alles aufzugeben, m8 mich traurig!

9. Literaturverzeichnis

- ¹ Schobert, R.; Schlenk, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4203-4221.
- ² Barkley, J.V.; Markopoulos, J.; Igglessi-Markopoulou, O. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1994**, 1057-1065.
- ³ Xu, J.; Hasegawa, M.; Harada, K.; Kobayashi, H.; Nagai, H.; Namikoschi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*(6), 852-854.
- ⁴ Biersack, B.; Diestel, R.; Jagusch, C.; Rapp, G.; Sasse, F.; Schobert, R. *Chem. Biodiv.* **2008**, *5*, 2423-2430.
- ⁵ [www.carsten-thoms.net/Bilder/Bild %20sponges](http://www.carsten-thoms.net/Bilder/Bild%20sponges)
- ⁶ Lin, Z.-J.; Lu, Z.-Y.; Zhu, T.-J.; Fang, Y.-C.; Gu, Q.-Q.; Zhu, W.-M. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*(2), 217-222.
- ⁷ <http://www.touring-afrika.de>
- ⁸ www.starfish.ch/photos/plants-Pflanzen/Aegiceras-corniculatum3
- ⁹ Wright, A.D.; Osterhage, C.; König, G.M. *J. Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 507-510.
- ¹⁰ Loscher, S.; Schobert, R. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 10619-10624.
- ¹¹ Karwowski, J.P.; Jackson, M.; Theriault, R.J.; Barlow, T.G.; Coen, L.; Hensey, D.M.; Humphrey, P.E. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1125-1132.
- ¹² Lee, V.J.; Branfman, A. R.; Herrin, T.R.; Rinehart, K.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 4225-4236.
- ¹³ Iwata, Y.; Maekawara, N.; Tanino, K.; Miyashita, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1532-1536.
- ¹⁴ Nowak, A.; Steffan, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3139-3141.
- ¹⁵ Longbottom, D.A.; Morrison, A.J.; Dixon, D.J.; Ley, S.V. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6955-6966.
- ¹⁶ Kauh, U.; Andernach, L.; Weck, S.; Sandjo, L.P.; Jacob, S.; Thines, E.; Opatz, T. *J. Org. Chem.* **2015**, *81*, 215-228.
- ¹⁷ Burke, L.T.; Dixon, D.J.; Ley, S.V.; Rodriguez, F. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3611-3613.
- ¹⁸ Daferner, M.; Timm, A.; Sterner, O. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7781-7784.
- ¹⁹ Sing, S.B.; Zink, D.L.; Heimbach, B.; Genilloud, O.; Teran, A.; Silverman, K.C.; Lingham, R.B.; Felock, P.; Hazuda, D. *J. Org. Lett.* **2002**, *4*, 1123-1126.
- ²⁰ Sy-Cordero, A.A.; Figueroa, M.; Raja, H.A.; Meza Aviña, M.E.; Croatt, M.P.; Adcock, A.F.; Kroll, D.J.; Wani, M.C.; Pearce, C.J.; Oberlies, N.H. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 8899-8904.
- ²¹ Sullivan, R.F.; Holtman, M.A.; Zylstra, G.J.; White, F.; Kobayashi, D.Y.Y. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 1079-1086.

-
- ²² Pettit, G.R.; Kamano, Y.; Dufresne, C.; Cerny, R.L.; Herald D.L.; Schmidt, J.M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 6005-6006.
- ²³ www.fritzles.de/2-37.jpg
- ²⁴ Wang, J.; Prinsep, M.R.; Gordon, D.P.; Page, M.J.; Copp, B.R. *J. Nat. Prod.*, **2015**, *78* (3), 530-533.
- ²⁵ Zhou, M.; Miao, M-M.; Du, G.; Li, X-N.; Shang, S-Z.; Zhao, W.; Liu, Z-H.; Yang, G-Y.; Che, C-T.; Hu, Q-F.; Gao, X-M. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5016-5019.
- ²⁶ Schaefer, A.L.; Greenberg, E.P.; Oliver, C.M.; Oda, Y.; Huang, J.J.; Bittan-Banin, G.; Peres, C.M. Schmidt, S.; Juhaszova, K.; Sufrin, J.R.; Harwood, C.S. *Nature*, **2008**, *454*, 595-600.
- ²⁷ Kaufmann, G.F.; Sartorio, R.; Lee, S.; Rogers, C.J.; Meijler, M.M.; Moss, J.A.; Clapham, B.; Brogan, A.P.; Dickerson, T.J.; Janda, K.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 309-314.
- ²⁸ Takase, H.; Nitanaï, H.; Hoshino, K.; Otani, T. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 4498-4504.
- ²⁹ Lacey, R.N. *J. Chem. Soc.* **1954**, 850-854.
- ³⁰ Pettit, G.R.; Herald, D.L.; Singh, S.B.; Thornton, T.J.; Mullaney, J.T. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6692-6693.
- ³¹ Löffler, J.; Schobert, R. *Recent Res. Devel. in Org. & Bioorg. Chem.* **1998**, *2*, 17-28.
- ³² Boeckman, R.K.; Starrett, J.E.; Nickell, D.G.; Sum, P.-E. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5549-5559.
- ³³ Noda, T. *Methods in Enzymology* **2008**, *451*, 27-31.
- ³⁴ Berridge, M.V.; Herst, P.M.; Tan, A.S. *Biotech. Ann. Rev.* **2005**, *11*, 127-152.
- ³⁵ Dissertation Randi Diestel; *Helmholtz-Zentr. f. Infektionsforschung*, Braunschweig.
- ³⁶ Manetsch, R.; Krasinski, A.; Radic, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K.B.; Kolb, H.C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12809-12818.
- ³⁷ Schobert, R.; Jagusch, C. *Tetrahedron* **2005**, *61* (9), 2301-2307.
- ³⁸ Emil Fischer und Lukas v. Mechel: Bildung aktiver, sekundärer Aminosäuren aus Halogensäuren und primären Aminen. [Aus dem Chemischen Institut der Universität Berlin] (Eingegangen am 6. Mai 1916).
- ³⁹ Sengoku, T.; Wierzejska, J.; Takahashi, M.; Yoda, H. *Synlett* **2010**, 2944-2946.
- ⁴⁰ Machida, S; Usuba, K.; Blaskovich, M.A.; Jano, A.; Harada, K.; Sebti, S.M.; Kato, N.; Ohkanda, J. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1392-1401.
- ⁴¹ Duffy, M.G.; Grayson D.H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, 1555-1563.
- ⁴² Strong, W.B.; Millar, J.G.; Grant, G.G.; Moreira, J.A.; Chong, J.M.; Rudolph, C. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **2008**, *126*, 67-77.
- ⁴³ Chong, J.M.; Heuft, M.A.; Rabbat, P. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5837-5838.

-
- ⁴⁴ Spencer, R.W.; Tam, T.F.; Thomas, E.; Robinson, V.J.; Krantz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5589-5597.
- ⁴⁵ Trost, B.M.; Lehr, K.; Michaelis, D.J.; Xu, J.; Buckl, A.K. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8915-8917.
- ⁴⁶ Schlenk, A.; Diestel, R.; Sasse, F.; Schobert, R. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2599-2604.
- ⁴⁷ Burke, L.T.; Dixon, D. J.; Ley, S. V.; Rodriguez, F. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 274-280.
- ⁴⁸ Hosoya, T.; Hiramatsu, T.; Ikemoto, T.; Nakanishi, M.; Aoyama, H.; Hosoya, A.; Iwata, T.; Maruyama, K.; Endo, M.; Suzuki, M. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 637-641.
- ⁴⁹ Hori, K.; Arai, M.; Nomura, K.; Yoshii, E. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 4368-4371.
- ⁵⁰ Jones, R.C.F.; Begley, M.J.; Peterson, G.E.; Sumaria, S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 1959-1968.
- ⁵¹ Schlenk, Andrea, Zulassungsarbeit Universität Bayreuth **2006**.
- ⁵² Schobert, R.; Siegfried, S.; Nieuwenhuyzen, M.; Milius, W.; Hampel, F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 1723-1730.
- ⁵³ Griechisch $\kappa\upsilon\kappa\lambda\omicron\varsigma$ - Kreis.
- ⁵⁴ Mündliche Überlieferung durch Sebastian Loscher nach seiner Epicoccamid- Synthese.
- ⁵⁵ Käsbeck, L.; Kessler, H. *Liebigs Ann./Recueil*, **1997**, 169-173.
- ⁵⁶ Bruckner, S.; Bilitewski, U.; Schobert, R. *Org. Lett.*, **2016**, *18* (5), 1136-1139.
- ⁵⁷ Beulshausen, T.; Groth, U.; Schöllkopf, U. *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, 523-526.
- ⁵⁸ Schobert, R.; Jagusch, C. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6129-6132.
- ⁵⁹ Werkhoven, T.M.; van Nispen, R.; Lugtenburg, J. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2909-2914.
- ⁶⁰ Bestmann, H.J.; Joachim, G.; Lengyel, I.; Oth, J.F.M.; Merényi, R.; Weitkamp, H. *Tetrahedron Lett.* **1966**, *28*, 3355-3358.
- ⁶¹ www.organische-chemie.ch
- ⁶² Fuchs, E.; Keller, M.; Breit, B. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6930-6939.
- ⁶³ Abe, M.; Imai, T.; Ishii, N.; Usui, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 303.
- ⁶⁴ Winterer, M.; Kempf, K.; Schobert, R. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (17), 7336.
- ⁶⁵ Sengoku, T.; Suzuki, K.; Nakayama, K.; Yagishita, F.; Sakamoto, M.; Takahashi, M.; Yoda, H. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 30775-30779.
- ⁶⁶ Hoshino, S.; Wakimoto, T.; Zhang, H.; Hayashi, F.; Okada, M.; Abe, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3953-3955.
- ⁶⁷ Biersack, B.; Diestel, R.; Jagusch, C.; Sasse, F.; Schobert, R. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 72-76.
- ⁶⁸ Imamura, N.; Adachi, K.; Sano, H. *J. Antibiot.* **1993**, *47* (2), 257-261.
- ⁶⁹ Petermichl, M.; Loscher, S.; Schobert, R. *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 10276-10279.
- ⁷⁰ Butt, N.A.; Moody, C.J. *Org. Lett.* **2011**, *13* (9), 2224-2227.

-
- ⁷¹ Die ersten beiden Fraktionen sind keine Tetramsäuren (Absorptionsmax. 270nm); sie kommen wahrscheinlich aus dem Gummistopfen der Hexanflasche (mit 0.1% HCOOH) und waren somit nur in der Probenlösung, nicht aber in der Probe.
- ⁷² Erste von zwei auf präparativer HPLC trennbaren Fraktionen.
- ⁷³ Nieuwenhuizen, W.F.; van Leeuwen, S.; Götz, F.; Egmond, M.R. *Chemistry and Physics of Lipids* **2002**, *114*, 181-191.
- ⁷⁴ Ley, S.V.; Smith, S.C.; Woodward, P.R. *Tetrahedron* **1992**, *48* (6), 1145-1174.
- ⁷⁵ Loscher, S.; Schobert, R. *Chemistry*, **19**, **2013**, 10619.
- ⁷⁶ Gu, K.; Bi, L.; Zhao, M.; Wang, C.; Ju, J.; Peng, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*(14), 4775-4799.
- ⁷⁷ Griechisch φαίνω: ich leuchte.
- ⁷⁸ Griechisch αἶθρ: Luft, Hauch.
- ⁷⁹ Griechisch μέθυ: Wein.
- ⁸⁰ Dankenswerterweise von Matthias Göhl bereitgestellte Albicansäure und Drimansäure (Göhl, M.; Seifert, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 6975-6982); Säurechlorid mit SOCl_2 siehe Methode im Anhang Manuskript 3.
- ⁸¹ Vielen Dank an Frau Professor Bilitewski und Sonja M. Höhmann für die Messungen.
- ⁸² Matsuo, K.; Adachi, M.; Takagi, T.; Ueno, S.; Arase, T.; Kuroi, F. *Heterocycles* **2005**, *65* (2), 377-385.
- ⁸³ Jones, R.C.F.; Peterson, G.E. *Tetrahedron Letters*, **1983**, *24*(43), 4751-4754.
- ⁸⁴ Ramachary, D.B.; Chowdari, N.S.; Barbas III, C.F. *Synlett.* **2003**, *12*, 1910-19142.
- ⁸⁵ Barry B. Snider and Qing Lu *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2839-2844.
- ⁸⁶ Jose L. Vicario, Andreas Job, Michael Wolberg, Michael Müller, Dieter Enders *Org. Lett.* **2002**, Vol. 4/ No. 6, 1023-1026
- ⁸⁷ Dieter Enders, Herbert Eichenauer *Tetrahedron Lett.* **1977**, *2*, 191-194.

Synthesis of Penicillenol C₁ and of a Bis-Azide Analogue for Photoaffinity Labeling

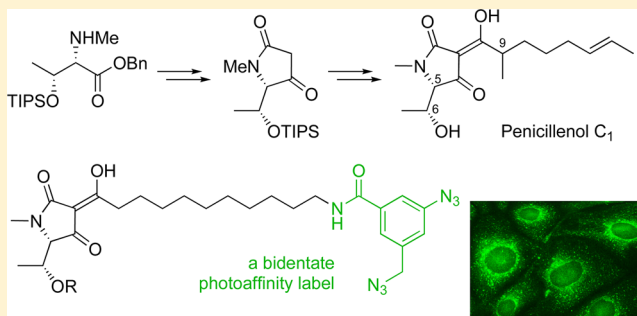
Karl Kempf,[†] Aruna Raja,[‡] Florenz Sasse,[‡] and Rainer Schobert*,[†]

[†]Organic Chemistry Laboratory, University Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany

[‡]Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstrasse 7, 38124 Braunschweig, Germany

S Supporting Information

ABSTRACT: Two diastereoisomers of the *Penicillium* metabolite penicillenol C₁ were synthesized for the first time by 3-acylation of an L-threonine-derived tetramic acid with enantiopure 2-methyloct-(6*E*)-enoic acids. The 5*S*,6*R*,9*S* isomer has NMR spectra and optical rotation identical with those of the natural compound. A bis-azide-tagged penicillenol analogue was also synthesized for photoaffinity labeling of target proteins. The photolysis of the bis-azide in the presence of methanol as a protein-mimicking nucleophile led to reaction only of the aryl azide, while leaving the benzyl azide available for pull-downs or the attachment of fluorescent tracers. As a proof of concept, the distribution of this bis-azide-tagged tetramic acid in living cells was visualized via a Staudinger ligation between the azide tag and a phosphane fluorophore.



INTRODUCTION

The penicillens 1 represent a small family of pyrrolidine-2,4-diones (aka tetramic acids)¹ that were isolated from *Penicillium* sp. GQ-7, an endophytic fungus associated with *Aegiceras corniculatum*.² They share the structural motif of an *N*-methylated tetramic acid derived from threonine and bearing an α -methyl branched C₈-fatty acyl residue at C-3 (Figure 1). The penicillens A₁ (1a) and A₂ (1b) were recently synthesized by Yoda et al. from L-threonine and D-allothreonine, respectively.³ By comparison with the reported NMR and optical rotation data of the natural products, their configurations were inferred to be (5*S*,6*R*,9*S*)-1a and (5*R*,6*R*,9*S*)-1b. The penicillens B₁ (1c) and B₂ (1d) also carry an α -methyloctanoyl residue of hitherto unspecified configuration yet have lost the stereogenic centers C-5 and C-6 due to elimination of water. For the penicillens C₁ (1e) and C₂ (1f) the discovering group assumed configurations at C-5 to be *S* for 1e and *R* for 1f on the grounds of CD and NMR spectra. So far, the penicillens have been only cursorily tested for biological activity, which is somewhat surprising, given the high incidence of biological effects reported for the closely related melophlins, metabolites of bacteria dwelling on the marine sponge *Melophlus sarsinorum*.⁴ Likewise, there are no data available for penicillens concerning their uptake by and distribution in cells.

Herein we describe a total synthesis of penicillenol C₁ (1e) that differs from Yoda's approach to the penicillens A by an early *N*-methylation of threonine and by the method of ring closure. We also report the synthesis of a bis-azide-tagged penicillenol analogue that should allow the identification of target proteins. Photolysis of one azide enables attachment to

nucleophilic residues in the protein, while visualization of the resulting protein–tetramate conjugate becomes possible via a Staudinger reaction of the second azide with a fluorescent phosphane. We provide evidence for the feasibility of this approach.

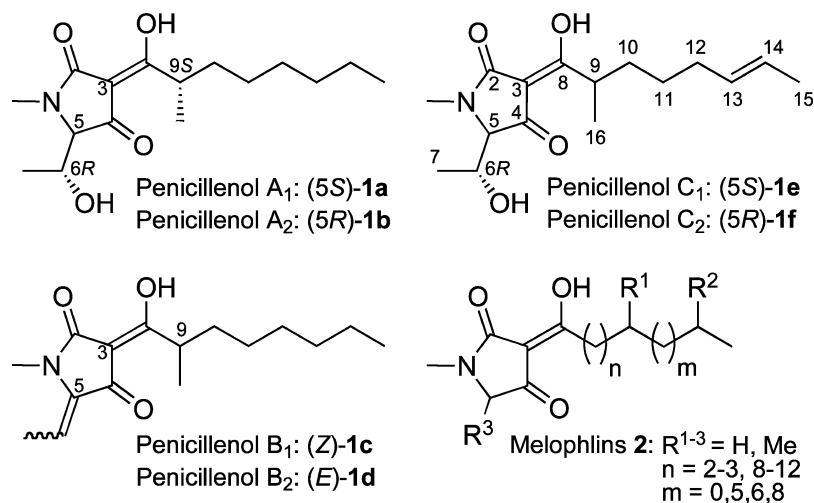
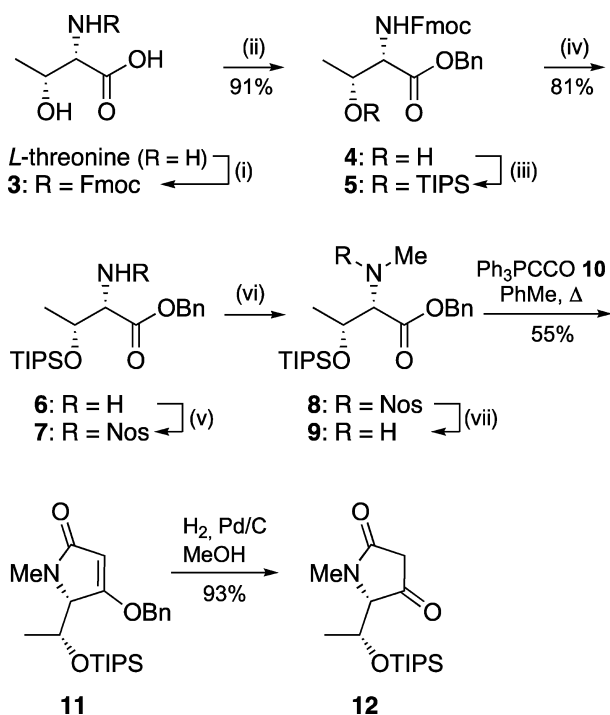
RESULTS AND DISCUSSION

Syntheses of Penicillenol C₁ ((5*S*,6*R*)-1e). We intended to synthesize 1e by 3-acylation of the tetramic acid 12 (Scheme 1). Preliminary studies⁵ had indicated that its benzyl ether 11 should be accessible by a Wittig-type cyclization reaction of the *O*-protected *N*-methylated L-threoninate 9 with the ylide Ph₃PCCO (10).⁶ This strategy differs from Yoda's synthesis of penicillens A, which was based on the cyclization of *N*,*O*-protected threonines with Meldrum's acid and an *N*-methylation postponed until the very last step.³ We now optimized the synthesis of the immediate cyclization precursor, benzyl (2*S*,3*R*)-2-methylamino-3-((triisopropylsilyl)oxy)-butanoate (9), so that only two intermediates, namely 4 and 6, required purification. L-Threonine was *N*-protected with *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide (=FmocONSu) to give carboxylic acid 3. This was converted to its Cs salt and treated with benzyl bromide to give the ester 4 in 91% yield after column chromatography. When it is prepared on a large scale, ester 4 can be purified conveniently by recrystallization from ethyl acetate. The β -hydroxy group of 4 was silylated with triisopropylsilyl triflate/NEt₃, affording the benzyl *N*-Fmoc-*O*-TIPS-threoninate 5 in 84% yield. Cleavage of the Fmoc group

Received: December 10, 2012

Published: February 25, 2013



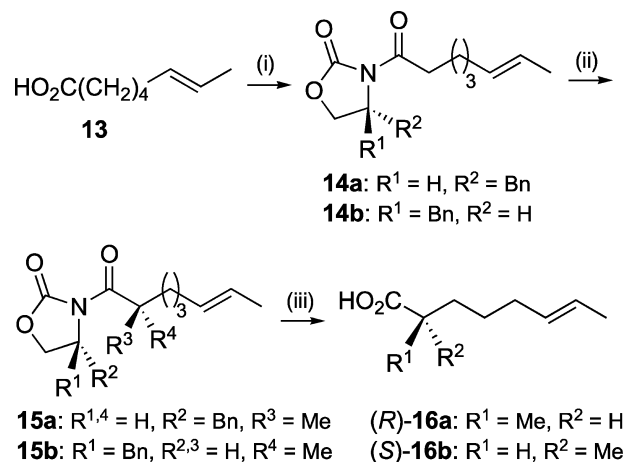
Figure 1. Structures of penicilllenols **1** and melophlins **2**.Scheme 1. Synthesis of Tetramic Acid **12**^a

^aReagents and conditions: (i) FmocONSu, dioxane, room temperature, 15 h; (ii) (a) Cs₂CO₃, MeOH; (b) BnBr, DMF, room temperature, 91% (based on L-threonine); (iii) TIPSOTf, NEt₃, CH₂Cl₂, room temperature, 2 h, 84%; (iv) piperidine, CH₂Cl₂, 0 °C, 15 min, 81%; (v) (o-NO₂)C₆H₄SO₂Cl, NEt₃, CH₂Cl₂, room temperature, 99%; (vi) MeI, K₂CO₃, DMF, room temperature, 94% (crude); (vii) PhSH, K₂CO₃, DMF, room temperature, 70% (based on **6**).

with piperidine gave the α-amino ester **6** in 81% yield upon chromatographic purification. For the mono-methylation of the amino group of **6**, it was first nosylated to the sulfonamide **7** and then methylated with MeI/K₂CO₃ to afford the tertiary sulfonamide **8**. This was N-deprotected with PhSH/K₂CO₃ to furnish the benzyl N-methyl-O-TIPS-threoninate **9** in 70% yield (over three steps) after chromatographic purification. Refluxing of a mixture of amino ester **9** and ylide **10** in toluene gave benzyl tetramate **11** in 55% yield via a domino sequence

comprised of amine addition to the C=C bond of **10** followed by an intramolecular Wittig olefination of the so-formed amide ylide. Hydrogenolysis of benzyl tetramate **11** eventually liberated tetramic acid **12**.

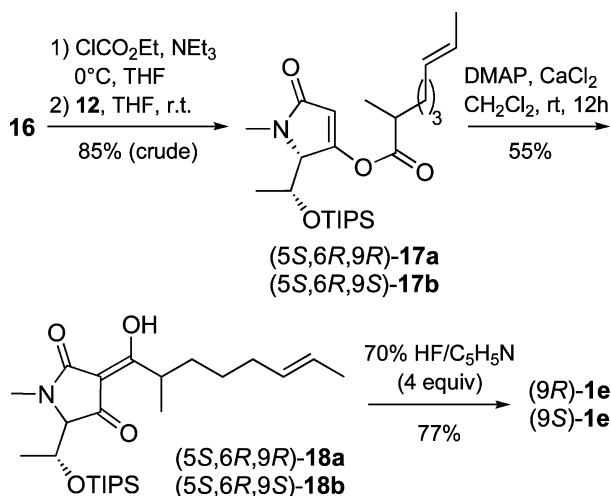
The (6E)-2-methyl-octenoic acid required for the 3-acylation of **12** was prepared by a stereoselective α-methylation of (6E)-octenoic acid **13**⁷ (Scheme 2). Given the ambiguity of the

Scheme 2. Synthesis of (6E)-2-Methyloctenoic Acids **16**^a

^aReagents and conditions: (i) (a) Me₃CCOCl, NEt₃, THF, -10 °C, (b) Evans auxiliary, NEt₃, LiCl, -10 °C (1 h) → 0 °C (2 h), 87%; (ii) NaHMDS, THF, -78 °C, then MeI, 3 h, 89% (95% de); (iii) LiOH, H₂O₂, THF, H₂O, 0 °C, 87%.

configuration at C-9 in the natural **1e**, we synthesized both enantiomers by applying the appropriate Evans (R)- and (S)-4-benzylloxazolidin-2-one auxiliaries. Their attachment afforded the enantiomeric imides **14a,b**, which were diastereoselectively (95% de) methylated to the corresponding α-methylamides **15a,b**. These were hydrolyzed to the (6E)-2-methyloctenoic acids **16** in 67% overall yield based upon **13**.

Tetramic acid **12** was then acylated with the carboxylic acids **16** under modified Yoshi⁸–Yoda³ conditions (Scheme 3). Treatment of the acids **16** with ethyl chloroformate/NEt₃ to give the mixed anhydride followed by addition of tetramic acid **12** led to the tetramates **17**. The 4-O → C-3 acyl shift in the presence of CaCl₂ as recommended by Yoda proceeded readily,

Scheme 3. Synthesis of Penicillenols C₁ (9R)-1e and (9S)-1e

affording the *O*-protected target compounds **18**. The cleavage of the silyl ether of **18** required exceptionally drastic conditions: namely, exposure to 4 equiv of 70% HF in pyridine for more than 12 h. Gratifyingly, deprotection went to completion without any signs of decomposition. The pure diastereoisomeric penicillenols C₁ (9R)-**1e** and (9S)-**1e** were obtained in almost 80% yield. This synthetic approach should be flexible enough to allow the preparation of structurally modified penicillenol analogues for an in-depth study of the biological properties of this family of 3-acyltetramic acids.

For the assignment of the configuration at C-9 of the natural penicillenol C₁ we compared the known chemical shifts in its ¹³C NMR spectrum² with those of our synthetic diastereomers. Table 1 shows a perfect match of indicative carbon signals for

Table 1. Chemical Shifts (δ ,^a ppm) of Indicative Carbon Atoms of Natural Penicillenol C₁ and Deviations of the Corresponding Shifts of Synthetic Penicillenols (9S)-1e and (9R)-1e

no. of C atom ^b	atom type	δ (natural 1e)	δ (natural 1e) – δ (9S-1e)	δ (natural 1e) – δ (9R-1e)
3	C ^q	101.1	0.0	–0.2
6	CH	66.7	0.0	0.1
8	C ^q	192.7	0.0	0.1
9	CH	36.3	0.0	0.2
10	CH ₂	33.0	0.0	–0.3
11	CH ₂	27.1	0.0	0.1
12	CH ₂	32.4	0.0	0.1
13	CH	130.8	0.0	0.1
16	CH ₃	17.2	0.0	0.2

^a¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ at 150 MHz (natural **1e**)² and 126 MHz (synthetic (9S)- and (9R)-**1e**). For a comparison of all signals cf. the Supporting Information. ^bCf. Figure 1.

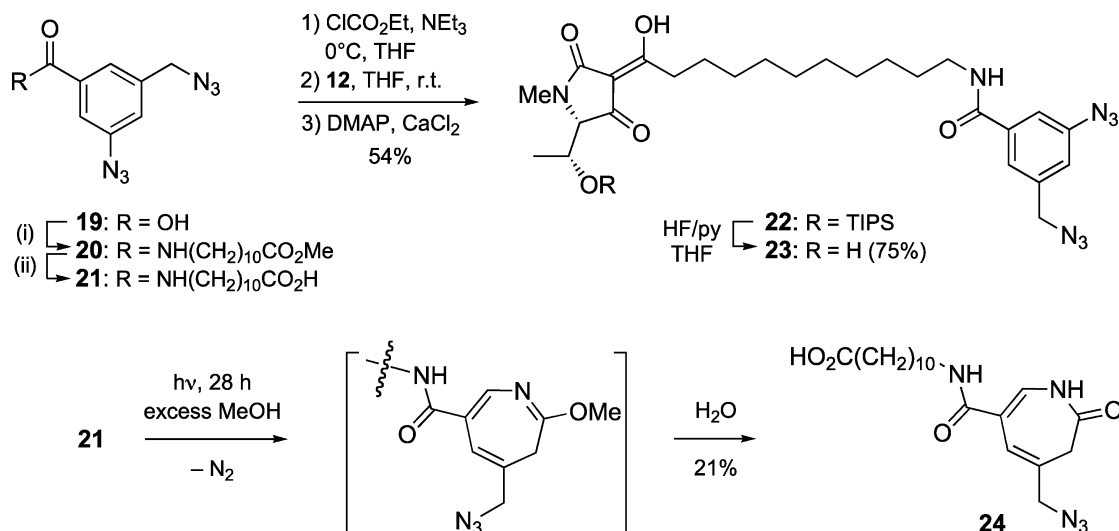
the isomer (9S)-**1e**. A comparison of the optical rotations further corroborates this assignment. Natural **1e** and synthetic (9S)-**1e** both show an optical rotation of $[\alpha]_D^{24} = -47^\circ$ ($c = 0.125$, MeOH), while isomer (9R)-**1e** has $[\alpha]_D^{24} = -12^\circ$ ($c = 0.125$, MeOH).

Synthesis and Preliminary Tests of a Bis-Azide-Tagged Penicillenol Photolabel. Little is known, yet, about the cellular targets of 3-acyltetramic acids. The Waldmann group showed by means of protein affinity pull-

downs that melophlin A (**2**: R^{1–3} = H, $n = 12$, $m = 0$) targets dynamins, GTPases crucial for endocytosis, cytokinesis, and signaling in eukaryotic cells.⁹ While studies with melophlins are problematic due to their high cytotoxicities, penicillenol C₁ is far less cytotoxic and so lends itself ideally to protein target identification in living cells. In cytotoxicity (MTT) assays with cells of murine L929 fibrosarcoma, human KB-3-1 cervix carcinoma, and nonmalignant PTK2 rat kangaroo kidney cells both diastereomers of **1e** were antiproliferative only at very high concentrations, with IC₅₀ (72 h) > 50 μ M (cf. the Supporting Information).

For a study of the protein targets of the penicillenols, we now prepared a derivative **23** that bears a known¹⁰ bis-azide photoaffinity label, allowing a two-step target identification (Scheme 4). Incubation of **23** with cell lysates and subsequent irradiation at ca. 250 nm should cleave the aryl azide to a reactive intermediate that covalently links the tetramic acid to its target protein. The remaining benzyl azide may then be attached via click or Staudinger reactions to fluorescence labels or an affinity compound such as biotin. Scheme 4 depicts the synthesis of the bis-azide-tagged tetramic acid **23** by 3-acylation of tetramic acid **12** with the carboxylic acid **21** under Yoda conditions, followed by *O*-desilylation of the intermediate **22** with HF in pyridine. The acid **21** was prepared by amidation of the known 3-azido-5-(azidomethyl)benzoic acid **19**¹¹ with methyl 11-aminoundecanoate¹² in the presence of propylphosphonic acid cyclic anhydride (T₃P) and subsequent saponification of the ester **20**. Scheme 4 also shows a photochemical trapping reaction of the bis-azido carboxylic acid **21** with methanol as a nucleophilic protein surrogate to prove the validity of step 1 of the concept. Acid **21** was used in lieu of the tetramic acid **23**, since it is available in larger amounts, is easier to purify, and precludes the possibility of unwanted side reactions between the tetramate and an excess of the nucleophile. This reaction was complete after 28 h of irradiation with a 150 W mercury lamp. For real qualitative protein labeling, far shorter irradiation times will suffice.¹⁰ The primary product imidate, resulting from loss of N₂ and trapping of the intermediate seven-membered cyclic azaallene with methanol, could not be isolated but was readily hydrolyzed upon workup to leave the stable β -azidomethylactam **24**, which was purified by HPLC and fully characterized. The bottom line is that the bis-azide label can be photolyzed to an intermediate that will link covalently to nucleophilic groups of proteins while retaining the benzyl azide for attachment of secondary fluorescence or affinity labels.

Finally, we tested whether the bis-azide-tagged tetramic acid **23** can be used to address particular subcellular components in living cells and if these can then be visualized by a Staudinger ligation between the azide(s) of **23** and a commercially available fluorescent dye–phosphane conjugate (DyLight488-phosphine, Thermo Scientific). PTK2 rat kangaroo kidney cells, which are flat and thus easy to observe, were incubated with **23** for 12 h and then fixed, permeabilized, and incubated with DyLight488-phosphine at 37 °C for 3 h. The images we obtained with a fluorescence microscope show an accumulation of green fluorescent dots, representing the tetramic acid **23**, in the vicinity of the cell nuclei (Figure 2). For a reliable identification of the subcellular target component, a colocalization with specific antibodies would be required. However, the important outcome of this test is that we can use bis-azide labels to trace the intracellular distribution of tetramic acids. In combination with the photolabeling of individual proteins we

Scheme 4. Synthesis of Bis-Azide-Tagged 3-Acyltetramic Acid **23** and Photoreaction of the Bis-Azide **21**^a

^aReagents and conditions: (i) T_3P , NEt_3 , $\text{ClH}_3\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{Me}$, CH_2Cl_2 , 0°C , 1 h, 96%; (ii) 2 NaOH , MeOH, room temperature, 18 h, 85%.

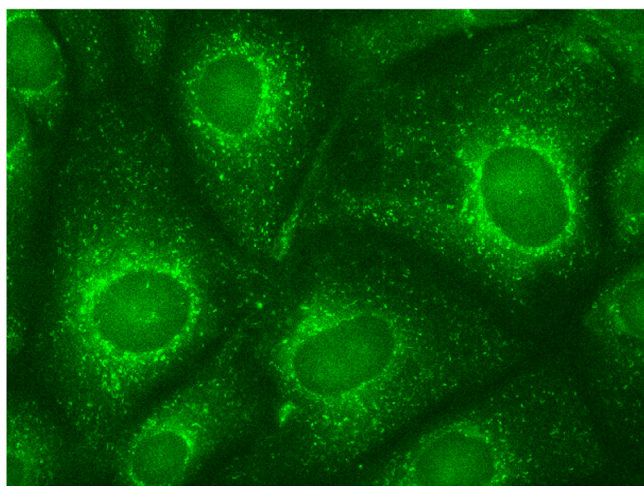


Figure 2. Distribution of bis-azide-tagged tetramic acid **23** (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in PTK2 cells, visualized with a Zeiss Axioplan fluorescence microscope (63 \times magnification) after Staudinger ligation with fluorescent DyLight488-phosphine.

should now be in a position to visualize and identify the molecular targets of tetramic acids. It should be noted that the bis-azide **21** did not accumulate in specific compartments of PTK2 cells but rather gave a faint greenish background indicative of a negligible uptake and an unspecific distribution.

CONCLUSIONS

The first synthesis of natural penicillenol C_1 (*5R,6S,9S*)-**1e** and its 9*R* diastereomer was based on the 3-acylation of a tetramic acid obtained by Wittig cyclization of a protected benzyl *L*-*N*-methylthreoninate with the phosphorus ylide Ph_3PCCO . The synthesis of the 3-acyl side chain used Evans auxiliaries for the introduction of the α -methyl branch. We also assigned the configuration at the carbon atom C-9 of the natural penicillenol C_1 to be *S* by comparison of NMR and optical rotation data. Since the cytotoxicity of penicillenol C_1 is low, it may be used as a probe to identify the proteins 3-acyltetramic acids interact with in living cells. We have demonstrated the feasibility of this strategy by test reactions with a bis-azide-tagged penicillenol C_1

analogue. Its phenyl azido group was selectively cleaved by light irradiation, and the resulting intermediate was trapped with methanol, representing the nucleophilic moieties within every protein. The remaining benzyl azide may then be used for the attachment of fluorescent tracers or bioaffinity groups. As an example, we tracked the distribution of the bis-azide-tagged tetramic acid in PTK2 kidney cells by a Staudinger ligation with a fluorophore–phosphane conjugate under a fluorescence microscope. We are now preparing structural variants of bis-azide-tagged tetramic acids, and we are also running the first actual photolabeling experiments with whole cell lysates to find optimum irradiation conditions.

EXPERIMENTAL SECTION

General Remarks. IR spectra were recorded with an FT-IR spectrophotometer equipped with an ATR unit. Chemical shifts of NMR signals are given in parts per million (δ) downfield from tetramethylsilane for ^1H and ^{13}C . Mass spectra were obtained under EI (70 eV) conditions. High-resolution mass spectra were obtained with a UPLC/Q-TOF MS system in ESI mode. For chromatography silica gel 60 (230–400 mesh) was used. HPLC was performed on Prontosil RP 200-5-C18, 5 μm , 250×4 mm (analytic) and 250×20 mm (preparative) columns.

(5*S*,6*R*)-4-(Benzyloxy)-1-methyl-5-((triisopropylsilyl)oxy)ethyl-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-one (11). A solution of benzyl (2*S*,3*R*)-2-methylamino-3-((triisopropylsilyl)oxy)butanoate (**9**; 560 mg, 1.48 mmol) and Ph_3PCCO (**10**; 530 mg, 1.65 mmol) in toluene (10 mL) was refluxed for 18 h and then concentrated under vacuum. The remainder was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 1/1, $R_f = 0.38$) to leave **11** (330 mg, 55%) as a colorless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 46^\circ$ ($c = 1$, CH_2Cl_2). IR (ATR): ν_{max} 2942, 2865, 1689, 1620, 1499, 1462, 1422, 1377, 1351, 1308, 1225, 1200, 1141, 1071, 989, 881, 846, 802, 755, 737, 716, 676 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.93–1.02 (m, 21 H), 1.09 (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H), 2.87 (s, 3 H), 3.86 (d, $J = 3.0$ Hz, 1 H), 4.32 (qd, $J = 6.3, 3.0$ Hz, 1 H), 4.84 (d, $J = 11.8$ Hz, 1 H), 4.89 (d, $J = 11.8$ Hz, 1 H), 5.09 (s, 1 H), 7.25–7.33 (m, 5 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 12.1, 17.8, 18.3, 27.5, 66.4, 67.4, 72.5, 95.6, 127.6, 128.2, 128.4, 134.8, 171.9, 173.3. MS (EI) m/z 403 [M^+], 359, 268, 226, 203, 201, 157, 115, 91. HRMS: calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{NO}_3\text{Si}^+$ 404.2615, found 404.2626 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

(5*S*,6*R*)-5-((triisopropylsilyl)oxy)ethyl-1-methylpyrrolidine-2,4-dione (12). A mixture of tetramate **11** (430 mg, 1.1 mmol), dry MeOH (50 mL), and 5% Pd on charcoal (170 mg) was flushed and then pressurized (1 bar, balloon) with H_2 gas and stirred at room

temperature for 8 h. After filtration over Celite and evaporation of the volatiles the residue was taken up in ethyl acetate. The solution was filtered over a short pad of silica and concentrated under reduced pressure to leave the product as a colorless oil. Yield: 320 mg (93%), $R_f = 0.38$ (cyclohexane/ethyl acetate 1/1). $[\alpha]_D^{28} = -20^\circ$ ($c = 1$, CH_2Cl_2). IR (ATR): ν_{max} 2943, 2892, 2867, 1771, 1694, 1463, 1374, 1333, 1244, 1141, 1089, 1067, 998, 882, 811, 750, 717, 679 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.00–1.05 (m, 21 H), 1.40 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H), 2.93 (t, $J = 0.8$ Hz, 1 H), 2.95 (dd, $J = 1.1$, 0.8 Hz, 1 H), 3.11 (dd, $J = 1.1$, 0.8 Hz, 3 H), 3.68 (ddquin, $J = 2.0$, 1.1, 0.8 Hz, 1 H), 4.50 (qd, $J = 6.7$, 2.0 Hz, 1 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 12.6, 17.8, 21.7, 30.1, 41.2, 68.8, 74.6, 169.8, 205.6. MS (EI): m/z 270 (100) $[\text{M} - \text{C}_3\text{H}_7]^+$, 228 (11), 226 (9), 213 (7), 201 (45), 184 (15), 171 (10), 157 (34), 129 (6), 124 (11), 115 (26), 87 (13), 75 (13), 73 (14), 59 (19), 43 (9). HRMS: calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{NO}_3\text{Si}^+$ 314.2151, found 314.2141 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(R)-4-Benzyl-3-((6E)-octenoyl)oxazolidin-2-one (14a). A solution of (6E)-octenoic acid (**13**;⁷ 0.48 g, 3.4 mmol) in dry THF (20 mL) at -10°C was treated with NEt_3 (1.18 mL, 8.5 mmol) followed by Me_3CCOCl (0.42 mL, 3.4 mmol). After the mixture was stirred at -10°C for 1 h, LiCl (0.22 g, 5.1 mmol) and (R)-4-benzylloxazolidin-2-one (0.60 g, 3.4 mmol) were added at this temperature. Stirring was continued for 1 h at -10°C and then for a further 2 h at 0°C . Saturated aqueous NH_4Cl solution (20 mL) was added, and the mixture was extracted twice with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/diethyl ether 7/1, $R_f = 0.24$). Yield: 0.89 g (87%) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{28} = -65^\circ$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2). IR (ATR): ν_{max} 3028, 2919, 2856, 1777, 1697, 1604, 1497, 1481, 1384, 1350, 1288, 1196, 1099, 1050, 1013, 965, 921, 843, 761 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.43–1.50 (m, 2 H), 1.58–1.83 (m, 5 H), 1.96–2.13 (m, 2 H), 2.77 (dd, $J = 13.4$, 9.3 Hz, 1 H), 2.82–3.05 (m, 2 H), 3.30 (dd, $J = 13.4$, 3.3 Hz, 1 H), 4.08–4.25 (m, 2 H), 4.67 (ddt, $J = 9.3$, 6.7, 3.3 Hz, 1 H), 5.34–5.55 (m, 2 H), 7.14–7.40 (m, 5 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 17.9, 23.7, 29.0, 32.3, 35.4, 37.9, 55.1, 66.1, 125.1, 127.3, 128.9, 129.4, 130.9, 135.3, 153.4, 173.3. MS (EI): m/z 301 (2) $[\text{M}^+]$, 246 (5), 190 (8), 178 (27), 159 (8), 142 (23), 134 (43), 125 (26), 117 (35), 97 (43), 92 (22), 91 (33), 86 (20), 81 (13), 69 (20), 75 (74). HRMS: calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{NO}_3^+$ 302.1751, found 302.1756 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(S)-4-Benzyl-3-((6E)-octenoyl)oxazolidin-2-one (14b). This compound was obtained from (S)-4-benzylloxazolidin-2-one as a colorless oil analogously to **14a**. Yield: 87%. $[\alpha]_D^{28} = 65^\circ$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2).

(4R,2'R,6'E)-4-Benzyl-3-(2'-methyloctenoyl)oxazolidin-2-one (15a). A solution of amide **14a** (0.45 g, 1.5 mmol) in THF (15 mL) at -78°C was treated dropwise with NaHMDS (1.5 M solution in THF, 1.5 mL, 2.3 mmol) and stirred for 30 min at this temperature. MeI (0.3 mL, 4.6 mmol) was added, and the reaction mixture was stirred for a further 3 h at -78°C . Saturated aqueous NH_4Cl solution (20 mL) was added, and the mixture was warmed to room temperature and then extracted twice with ethyl acetate. The organic extracts were washed with brine, dried, and concentrated. Column chromatography (cyclohexane/diethyl ether 10/1) left 0.44 g (89%) of **15a** as a colorless oil with $R_f = 0.55$ (cyclohexane/ethyl acetate 3/1). $[\alpha]_D^{28} = -79^\circ$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2). 95% de (GC). IR (ATR): ν_{max} 2927, 2855, 1776, 1695, 1604, 1497, 1454, 1383, 1348, 1289, 1238, 1208, 1195, 1100, 1075, 1015, 966, 921, 838, 761 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.26 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H), 1.34–1.46 (m, 3 H), 1.67 (dt, $J = 4.9$, 1.0 Hz, 3 H), 1.73–1.86 (m, 1 H), 1.95–2.10 (m, 2 H), 2.81 (dd, $J = 13.3$, 9.6 Hz, 1 H), 3.30 (dd, $J = 13.3$, 3.3 Hz, 1 H), 3.75 (qt, $J = 6.9$, 6.5 Hz, 1 H), 4.15–4.27 (m, 2 H), 4.71 (ddt, $J = 9.6$, 6.7, 3.3 Hz, 1 H), 5.34–5.54 (m, 2 H), 7.18–7.44 (m, 5 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 17.4, 17.9, 27.1, 32.5, 32.9, 37.6, 37.9, 55.3, 66.0, 125.1, 127.3, 128.9, 129.4, 130.9, 135.3, 153.0, 177.3. MS (EI): m/z 315 (10) $[\text{M}^+]$, 233 (100), 218 (10), 190 (6), 178 (72), 159 (5), 139 (81), 117 (55), 111 (29), 91 (53), 82 (42). HRMS: calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{NO}_3^+$ 316.1907, found 316.1920 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(4S,2'S,6'E)-4-Benzyl-3-(2'-methyloctenoyl)oxazolidin-2-one (15b). This compound was obtained from **14b** as a colorless oil analogously to **15a**. Yield: 89%. $[\alpha]_D^{28} = 79^\circ$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2).

(2R,6E)-2-Methyloctenoic Acid (16a). A solution of amide **15a** (0.70 g, 2.2 mmol) in THF/ H_2O (88 mL, 10/1) at 0°C was treated with LiOH (0.35 g, 8.4 mmol) and H_2O_2 (30% in H_2O , 1.2 mL, 11.3 mmol) and stirred for 2 h at room temperature. Me_2S (0.9 mL, 11.3 mmol) was added, and the resulting mixture was stirred for another 10 min. It was acidified with 1 M NaHSO_4 solution and extracted three times with ethyl acetate. The organic extracts were washed with brine, dried, and concentrated. Column chromatography (cyclohexane/diethyl ether 7/1) left **16a** (0.30 g, 87%) as a colorless oil with $R_f = 0.42$ (cyclohexane/ethyl acetate/acetic acid 100/33/1). $[\alpha]_D^{28} = -17^\circ$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2). IR (ATR): ν_{max} 2933, 2858, 1702, 1464, 1416, 1378, 1289, 1237, 1076, 963 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.18 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 1.33–1.48 (m, 3 H), 1.64 (d, $J = 4.7$ Hz, 3 H), 1.66–1.75 (m, 1 H), 1.93–2.04 (m, 2 H), 2.45 (qt, $J = 7.0$, 6.3 Hz, 1 H), 5.29–5.53 (m, 2 H), 11.22 (br. s, 1 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 16.8, 17.9, 27.0, 32.4, 33.0, 39.3, 125.2, 130.8, 183.3. MS (EI): m/z 156 (15) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 138 (21), 110 (9), 101 (6), 95 (5), 87 (22), 83 (75), 74 (100), 69 (27), 68 (32), 55 (88). Anal. Calcd for $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_2$: C, 69.19; H, 10.32. Found: C, 68.89; H, 10.35.

(2S,6E)-2-Methyloctenoic Acid (16b). This compound was obtained from **15b** as a colorless oil analogously to **16a**. Yield: 87%. $[\alpha]_D^{28} = 17^\circ$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2). HRMS: calcd for $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_2^+$ 155.1078, found 155.1068.

(5S)-3-((2'R,6'E)-1'-Hydroxy-2'-methylocten-1'-ylidene)-5-((R)-1''-(trisopropylsilyloxy)ethyl)-1-methylpyrrolidine-2,4-dione (18a). A solution of acid **16a** (0.35 g, 2.2 mmol) and NEt_3 (0.70 mL, 5.1 mmol) in THF (20 mL) was cooled to 0°C and treated dropwise with ethyl chloroformate (272 μL , 2.8 mmol). After 1 h tetramic acid **12** (0.63 g, 2.0 mmol) was added and the resulting mixture was stirred at room temperature for 12 h and then concentrated under vacuum. The residue was taken up in CH_2Cl_2 and washed with dilute NaHSO_4 solution. The water phase was re-extracted with CH_2Cl_2 , and the combined organic layers were dried and concentrated under reduced pressure. The crude 4-O-acyltetramic acid **17a** was dissolved in CH_2Cl_2 (20 mL), cooled to 0°C , and treated with DMAP (0.49 g, 4.0 mmol) and dry CaCl_2 (0.44 g, 4.0 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 8 h and then washed with 0.05 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ solution. The water phase was re-extracted with CH_2Cl_2 , and the combined organic layers were dried and concentrated. The crude product was dissolved in MeOH (17 mL), treated with water (3 mL) to give a milky emulsion, and centrifuged to leave **18a** as a red oil. Purification by HPLC (rinsing with 85% MeOH, then elution with 100% MeOH) afforded 468 mg (55%) of **18a** as a red oil consisting of a 5.6/1 mixture of the two tautomers A/B. $[\alpha]_D^{28} = -63^\circ$ ($c = 1$, CH_2Cl_2). IR (ATR): ν_{max} 2939, 2866, 1710, 1651, 1614, 1461, 1376, 1329, 1264, 1213, 1139, 1096, 1069, 997, 965, 921, 881, 809, 778, 755, 704 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.96–1.04 (m, 21 H), 1.16 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H), 1.27–1.39 (m, 3 H), 1.36^B/1.43^A (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H), 1.59–1.72 (m, 1 H), 1.62 (dt, $J = 4.7$, 1.2 Hz, 3 H), 1.90–2.02 (m, 2 H), 3.05^B/3.10^A (s, 3 H), 3.47^A (d, $J = 1.9$ Hz, 1 H), 3.55^A (ddq, $J = 7.4$, 7.1, 6.9 Hz, 1 H), 3.70^B (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H), 3.77^B (tq, $J = 7.7$, 6.9 Hz, 1 H), 4.56 (qd, $J = 6.6$, 1.9 Hz, 1 H), 5.30–5.49 (m, 2 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 12.5^B/12.6^A, 17.4, 17.9^B/18.0^A, 22.8, 27.2/27.3, 28.9, 32.56, 32.62, 35.6^B/36.1^A, 67.6^B/67.9^A, 69.4^B/72.4^A, 100.8, 125.0, 130.9, 174.4, 190.8, 193.0. MS (EI): m/z 451 (<1) $[\text{M}]^+$, 408 (100) $[\text{M} - \text{C}_3\text{H}_7]^+$, 394 (10), 364 (17), 251 (17), 201 (33), 157 (32), 149 (15), 115 (9). HRMS: calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{NO}_4\text{Si}^+$ 452.3196, found 452.3192 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(5S)-3-((2'S,6'E)-1'-Hydroxy-2'-methylocten-1'-ylidene)-5-((R)-1''-(trisopropylsilyloxy)ethyl)-1-methylpyrrolidine-2,4-dione (18b). A 160 mg amount (55%) was obtained as a red oil, consisting of a 7/1 mixture of the two tautomers A/B, analogously to **18a**, from **12** (207 mg, 0.66 mmol) and **16b** (113 mg, 0.73 mmol). $[\alpha]_D^{28} = -104^\circ$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2). IR (ATR): ν_{max} 2938, 2866, 1712, 1647, 1615, 1488, 1462, 1375, 1328, 1262, 1214, 1140, 1096, 1069, 967, 924, 882, 797, 753, 702, 679 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.97–1.02 (m, 21 H), 1.13^A/1.17^B (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H), 1.27–1.34

(m, 2 H), 1.36^B/1.44^A (d, $J = 6.6^B/6.9^A$ Hz, 3 H), 1.39–1.49 (m, 1 H), 1.62 (dt, $J = 4.7, 1.1$ Hz, 3 H), 1.64–1.74 (m, 1 H), 1.88–2.01 (m, 2 H), 3.05^B/3.11^A (s, 3 H), 3.48^A (d, $J = 1.6$ Hz, 1 H), 3.59^A (dq, $J = 8.5, 6.7, 6.3$ Hz, 1 H), 3.70^B (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H), 3.76^B (q, $J = 6.7$ Hz, 1 H), 4.57 (qd, $J = 6.9, 1.6$ Hz, 1 H), 5.27–5.48 (m, 2 H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 12.5^B/12.6^A, 16.7, 17.94^B/17.97^A, 23.0, 27.1, 29.0, 32.5, 33.5, 35.7, 67.5^B/68.1^A, 68.4^B/72.5^A, 101.2, 125.1, 130.9, 174.4, 190.5, 193.2. MS (EI): m/z 451 (<1) [M]⁺, 408 (100) [M – C₃H₇]⁺, 394 (4), 364 (16), 251 (10), 201 (29), 157 (28), 115 (9). HRMS: calcd for C₂₅H₄₅KNO₄Si⁺ 490.2749, found 490.2762 [M + K]⁺.

(9R)-Penicillenol C₁ ((5S,6R,9R)-1e). A solution of **18a** (136 mg, 0.30 mmol) in THF (500 μ L) in a plastic vial was treated with HF (70% in pyridine, 33 μ L, 1.2 mmol, 4 equiv) and stirred overnight. The reaction was quenched by stirring with Et₃SiH (191 μ L, 1.2 mmol) for 30 min (Caution! the vessel must not be tightly sealed!) and subsequent pouring into MeOH/water (77/23, 8 mL). Centrifugation and purification by HPLC (MeOH/H₂O 77/23 + 0.1% HCO₂H, flow rate 10 mL/min, t_R of major isomer 29 min) left 69 mg (77%) of ((5S,6R,9R)-1e as a red oil. $[\alpha]_D^{25} = -12^\circ$ ($c = 0.125$, MeOH). IR (ATR): ν_{\max} 3448 br, 2972, 2934, 2157, 1698, 1602, 1453, 1408, 1377, 1339, 1259, 1212, 1121, 1087, 965, 851, 810, 797, 766, 710 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.11 (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H), 1.16 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H), 1.27–1.38 (m, 2 H), 1.40–1.53 (m, 1 H), 1.61 (d, $J = 5.2$ Hz, 3 H), 1.64–1.73 (m, 1 H), 1.90–1.99 (m, 2 H), 2.97 (s, 3 H), 3.57 (ddq, $J = 8.0, 6.9, 6.6$ Hz, 1 H), 3.78 (d, $J = 4.4$ Hz, 1 H), 4.17 (qd, $J = 6.9, 4.4$ Hz, 1 H), 5.26–5.47 (m, 2 H). ¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ 17.0, 17.5, 17.9, 27.0, 27.1, 32.3, 33.3, 36.1, 66.6, 68.5, 101.3, 125.2, 130.7, 174.1, 192.6, 194.9. MS (EI): m/z 295 (58) [M]⁺, 277 (10), 251 (100), 233 (11), 213 (53), 204 (17), 182 (13), 169 (40), 151 (9), 140 (78), 139 (55), 113 (34), 112 (11). HRMS: calcd for C₁₆H₂₆NO₄⁺ 296.1862, found 296.1856 [M + H]⁺.

(9S)-Penicillenol C₁ ((5S,6R,9S)-1e). A 38 mg amount (77%) was obtained analogously to ((5S,6R,9R)-1e from **18b** (51 mg, 0.17 mmol). $[\alpha]_D^{25} = -47.0^\circ$ ($c = 0.125$, MeOH). IR (ATR): ν_{\max} 3454 br, 2971, 2932, 2858, 1702, 1602, 1453, 1407, 1376, 1338, 1258, 1212, 1121, 1087, 965, 851, 811, 796, 768, 710 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.13 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H), 1.17 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H), 1.27–1.40 (m, 2 H), 1.41–1.52 (m, 1 H), 1.61 (d, $J = 4.7$ Hz, 3 H), 1.63–1.74 (m, 1 H), 1.90–2.00 (m, 2 H), 2.98 (s, 3 H), 3.55 (ddq, $J = 8.0, 6.9, 6.6$ Hz, 3 H), 3.78 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H), 4.18 (qd, $J = 6.6, 4.5$ Hz, 2 H), 5.24–5.50 (m, 2 H). ¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ 17.2, 17.7, 17.9, 27.1, 27.2, 32.4, 33.0, 36.3, 66.7, 68.6, 101.1, 125.2, 130.8, 174.1, 192.7, 194.8. MS (EI): m/z 295 (20) [M]⁺, 277 (8), 251 (63), 233 (9), 213 (37), 204 (19), 182 (16), 169 (36), 151 (13), 140 (100), 139 (62), 113 (32), 112 (14). HRMS: calcd for C₁₆H₂₆NO₄⁺ 296.1862, found 296.1863 [M + H]⁺.

Methyl 11-(3-Azido-5-(azidomethyl)benzamido)undecanoate (20). An ice-cold solution of 3-azido-5-(azidomethyl)benzoic acid (**19**; 1.07 g, 4.9 mmol), methyl 11-aminoundecanoate hydrochloride¹² (1.85 g, 7.36 mmol), and NEt₃ (2.73 mL, 19.6 mmol) in CH₂Cl₂ (60 mL) was treated dropwise with tripropanephosphonic acid anhydride (T₃P; 50% in THF, 3.38 mL, 5.6 mmol) and stirred for 1 h. Water was added, the phases were separated, the aqueous layer was re-extracted twice with CH₂Cl₂, and the combined organic phases were dried and concentrated. Column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3/1, $R_f = 0.24$) left **20** (1.95 g, 96%) as a light brown solid with mp 52 °C. IR (ATR): ν_{\max} 3305, 2926, 2854, 2100, 1736, 1640, 1592, 1538, 1437, 1344, 1312, 1278, 1209, 1170, 1110, 998, 859, 764, 698 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.19–1.38 (m, 12 H), 1.58 (m, 4 H), 2.27 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 3.40 (q, $J = 7.0$ Hz, 2 H), 3.63 (s, 3 H), 4.36 (s, 2 H), 6.47 (t, $J = 6.3$ Hz, 1 H), 7.05 (dd, $J = 2.1, 1.5$ Hz, 1 H), 7.38 (t, $J = 1.9$ Hz, 1 H), 7.43 (t, $J = 1.5$ Hz, 1 H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 24.5, 24.7, 26.9, 28.7, 29.1, 29.2, 29.3, 29.5, 34.0, 40.2, 53.9, 63.9, 118.8, 121.4, 124.0, 131.7, 140.7, 143.3, 166.2, 174.3. MS (EI): m/z 415 (21) [M]⁺, 384 (19), 345 (44), 317 (29), 313 (25), 285 (10), 231 (20), 201 (27), 175 (42), 161 (24), 145 (43), 118 (33), 83 (30), 69 (51), 56 (100). HRMS: calcd for C₂₀H₂₉N₇NaO₃⁺ 438.2230, found 438.2238 [M + Na]⁺.

11-(3-Azido-5-(azidomethyl)benzamido)undecanoic Acid (21). A mixture of ester **20** (0.75 mg, 1.8 mmol), MeOH (40 mL), water (10 mL), and NaOH (0.14 g, 3.6 mmol) was stirred at room temperature for 18 h and then concentrated under reduced pressure. The remainder was extracted three times with CH₂Cl₂, and the extracts were dried, concentrated, and purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate/HOAc 1/1/0.01, $R_f = 0.32$). Yield: 0.61 g (85%) as a white solid with mp 78 °C. IR (ATR): ν_{\max} 3292, 2918, 2851, 2107, 2081, 1694, 1631, 1592, 1534, 1468, 1439, 1410, 1330, 1317, 1299, 1278, 1267, 1241, 1215, 1190, 1118, 1078, 1019, 920, 879, 795, 766 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.23–1.40 (m, 12 H), 1.53–1.66 (m, 4 H), 2.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H), 3.41 (td, $J = 7.1, 5.9$ Hz, 2 H), 4.37 (s, 2 H), 6.43 (t, $J = 5.9$ Hz, 1 H), 7.06 (t, $J = 1.8$ Hz, 1 H), 7.38 (t, $J = 1.8$ Hz, 1 H), 7.41–7.47 (m, 1 H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 24.6, 26.9, 28.9, 29.05, 29.13, 29.2, 29.3, 29.4, 34.0, 40.3, 53.9, 117.5, 120.9, 122.6, 137.1, 138.0, 141.3, 166.2, 179.2. MS (EI): m/z 401 (24) [M]⁺, 375 (9), 345 (5), 342 (32), 331 (27), 313 (45), 303 (35), 289 (10), 275 (9), 261 (8), 231 (16), 201 (22), 190 (19), 184 (20), 175 (28), 164 (50), 162 (48), 147 (40), 145 (48), 136 (35), 122 (40), 106 (20), 90 (33), 83 (26), 69 (48), 63 (42), 56 (100). HRMS: calcd for C₁₉H₂₇N₇NaO₃⁺ 424.2068, found 424.2067 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₉H₂₇N₇O₃: C, 56.84; H, 6.78; N, 24.42. Found: C, 56.96; H, 6.80; N, 24.13.

(5S)-3-(1'-Hydroxy-11'-(3-azido-5-(azidomethyl)benzamido)undecan-1'-ylidene)-5-((R)-1''-(triisopropylsilyl)oxy)ethyl)-1-methylpyrrolidine-2,4-dione (22). Analogously to **18**, 3-acyltetramic acid **22** (244 mg, 54%) was obtained as a red oil from bis-azido acid **21** (0.26 g, 0.65 mmol) and tetramic acid **12** (0.24 g, 0.77 mmol). $[\alpha]_D^{25} = -59^\circ$ ($c = 0.8$, CH₂Cl₂). IR (ATR): ν_{\max} 3330, 2926, 2864, 2105, 1712, 1607, 1540, 1461, 1374, 1324, 1281, 1214, 1139, 1096, 1068, 975, 921, 882, 780, 754 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.95–1.03 (m, 21 H), 1.23–1.38 (m, 12 H), 1.42 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.53–1.69 (m, 4 H), 2.77 (m, 2 H), 3.09 (s, 3 H), 3.43 (q, $J = 6.3$ Hz, 2 H), 3.47 (d, $J = 1.6$ Hz, 1 H), 4.39 (s, 2 H), 4.54 (qd, $J = 6.8, 1.6$ Hz, 1 H), 6.20–6.38 (m, 1 H), 7.06 (s, 1 H), 7.38 (s, 1 H), 7.45 (s, 1 H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 12.5, 17.9, 22.8, 25.7, 26.9, 29.0, 29.16, 29.18, 29.21, 29.25, 29.3, 29.5, 32.5, 40.3, 53.9, 68.1, 72.4, 101.6, 117.5, 120.9, 122.6, 137.3, 138.0, 141.3, 166.1, 174.1, 186.7, 193.3. MS (EI): m/z 653 (100) [M – C₃H₇]⁺, 582 (4), 553 (6), 496 (72), 479 (25), 453 (29), 435 (12), 392 (3), 322 (10), 270 (22), 201 (54), 157 (62), 147 (12), 131 (56), 115 (29), 103 (43), 87 (15), 75 (40), 73 (22), 61 (22), 55 (12), 43 (60). HRMS: calcd for C₃₅H₅₆N₈NaO₅⁺ 719.4041, found 719.4023 [M + Na]⁺.

(5S)-3-(1'-Hydroxy-11'-(3-azido-5-(azidomethyl)benzamido)undecan-1'-ylidene)-5-((R)-1''-hydroxyethyl)-1-methylpyrrolidine-2,4-dione (23). Analogously to **1e**, 3-acyltetramic acid **23** (65 mg, 75%) was obtained from **22** (111 mg, 0.16 mmol) as a red oil. $[\alpha]_D^{25} = -31^\circ$ ($c = 1.0$, MeOH). IR (ATR): ν_{\max} 3305 br, 2926, 2854, 2105, 1706, 1637, 1606, 1541, 1455, 1373, 1313, 1260, 1213, 1088, 1025, 945, 860, 801, 763 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.14 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H), 1.24–1.40 (m, 12 H), 1.56–1.71 (m, 4 H), 2.82 (td, $J = 7.5, 1.6$ Hz, 2 H), 2.98 (s, 3 H), 3.44 (td, $J = 7.0, 6.0$ Hz, 2 H), 3.79 (d, $J = 4.7$ Hz, 1 H), 4.19 (qd, $J = 6.6, 4.7$ Hz, 1 H), 4.40 (s, 2 H), 6.15–6.22 (m, 1 H), 7.06–7.11 (m, 1 H), 7.40 (t, $J = 1.6$ Hz, 1 H), 7.42–7.48 (m, 1 H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 17.8, 26.9, 27.2, 29.01, 29.04, 29.18, 29.21, 29.3, 29.6, 32.8, 40.3, 54.0, 66.7, 68.6, 101.8, 117.5, 121.0, 122.6, 127.9, 137.3, 141.4, 166.0, 173.9, 188.7, 194.9; HRMS: calcd for C₂₆H₃₇N₈O₅⁺ 541.2887, found 541.2920 [M + H]⁺.

11-((2E,4E)-5-Azidomethyl-7-oxo-1H-azepine-3-carboxamido)undecanoic Acid (24). A solution of bisazide **21** (148 mg, 0.37 mmol) in MeOH (3 mL) was irradiated for 28 h with a 150 W Mercury UV lamp in a quartz cuvette from a distance of 10 cm. Purification by HPLC (MeOH/H₂O 65/35 + 0.1% HCOOH) gave three main fractions ($t_R = 22, 26.5, 39$ min, flow rate 10 mL/min). The third fraction contained the main product imide, which hydrolyzed upon evaporation to leave amide **24**. The latter was also found in the first fraction. The second fraction contained a different unspecified azide. The first and third fractions had identical IR and ¹H NMR spectra as well as identical retention times in analytical HPLC. They

were pooled to afford 30 mg (21%) of **24** as a white solid with mp 76 °C. IR (ATR): ν_{max} 2926, 2853, 2103, 1703, 1657, 1627, 1585, 1541, 1436, 1367, 1295, 1263, 1181, 1110, 1015, 885, 799, 759 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.26–1.38 (m, 12 H), 1.52–1.66 (m, 4 H), 2.34 (t, J = 7.4 Hz, 2 H), 2.94 (s, 2 H), 3.35 (dd, J = 7.1, 6.0 Hz, 2 H), 4.03 (s, 2 H), 5.65–5.79 (m, 1 H), 6.33–6.54 (m, 1 H), 7.33 (d, J = 5.2 Hz, 1 H), 8.21–8.37 (m, 1 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz): δ 24.6, 26.7, 28.8, 28.90, 28.95, 29.0, 29.1, 29.4, 33.7, 39.4, 40.1, 56.1, 119.6, 121.5, 129.3, 131.5, 165.9, 166.6, 177.7. MS (EI): m/z 392 (80) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 349 (10), 331 (10). HRMS: calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_4^+$ 392.2292, found 392.2304 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Distribution of Bis-Azide-Tagged Tetramic Acid **23 in PTK2 Cells.** PTK2 cells were incubated overnight with compound **23** (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and then fixed and permeabilized with formaldehyde (4%) and Triton X-100. The cells were then treated with DyLight488-phosphine (Thermo Scientific), incubated at 37 °C for 3 h, irradiated at 245 nm for 15 min, and finally photographed through a Zeiss Axioplan fluorescence microscope at 63 \times magnification.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Tables and figures giving ^1H and ^{13}C NMR spectra of **11–16**, **18**, **20–24**, (9*R*)-**1e**, and (9*S*)-**1e**, details of the cytotoxicity of (9*S*)-**1e**, (9*R*)-**1e**, and **21**, and chemical ^{13}C shifts of natural and synthetic **1e**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail for R.S.: Rainer.Schobert@uni-bayreuth.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Scho 402/9-2). We are indebted to Dr. Holger Schmidt, Department of Plant Physiology, University Bayreuth, for high-resolution mass spectra.

■ REFERENCES

- (1) (a) Schobert, R.; Schlenk, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4203–4221. (b) Royles, B. J. L. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1981–2001.
- (2) Lin, Z.-J.; Lu, Z.-Y.; Zhu, T.-J.; Fang, Y.-C.; Gu, Q.-Q.; Zhu, W.-M. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 217–221.
- (3) (a) Sengoku, T.; Wierzejska, J.; Takahashi, M.; Yoda, H. *Synlett* **2010**, 2944–2946. (b) Sengoku, T.; Nagae, Y.; Ujihara, Y.; Takahashi, M.; Yoda, H. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4391–4401.
- (4) (a) Aoki, S.; Higuchi, K.; Ye, Y.; Satari, R.; Kobayashi, M. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1833–1836. (b) Wang, C.-Y.; Wang, B.-G.; Wiryowidagdo, S.; Wray, V.; van Soest, R.; Steube, K. G.; Guan, H.-S.; Proksch, P.; Ebel, R. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 51–56. (c) Xu, J.; Hasegawa, M.; Harada, K.-I.; Kobayashi, H.; Nagai, H.; Namikoshi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 852–854. (d) Biersack, B.; Diestel, R.; Jagusch, C.; Rapp, G.; Sasse, F.; Schobert, R. *Chem. Biodiv.* **2008**, *5*, 2423–2430. (e) Schobert, R.; Jagusch, C. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2301–2307. (f) Biersack, B.; Diestel, R.; Jagusch, C.; Sasse, F.; Schobert, R. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 72–76.
- (5) Loke, I.; Park, N.; Kempf, K.; Jagusch, C.; Baro, A.; Schobert, R.; Laschat, S. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 697–704.
- (6) (a) Schobert, R.; Dietrich, M.; Mullen, G.; Urbina-Gonzalez, J.-M. *Synthesis* **2006**, *22*, 3902–3914. (b) Schobert, R.; Jagusch, C. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2301–2307. (c) Schobert, R.; Jagusch, C.; Melanophy, C.; Mullen, G. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3524–3529.
- (7) Levin, D.; Warren, S. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 505–508.
- (8) Hori, N. K.; Arai, M.; Nomura, K.; Yoshii, E. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 4368–4371.
- (9) Knoth, T.; Warburg, K.; Katzka, C.; Rai, A.; Wolf, A.; Brockmeyer, A.; Janning, P.; Reubold, T. F.; Eschenburg, S.; Manstein, D. J.; Hübel, K.; Kaiser, M.; Waldmann, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 7240–7245.
- (10) Hosoya, T.; Hiramatsu, T.; Ikemoto, T.; Nakanishi, M.; Aoyama, H.; Hosoya, A.; Iwata, T.; Maruyama, K.; Endo, M.; Suzuki, M. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 637–641.
- (11) Neelapapu, R.; Holzle, D. L.; Velaparthi, S.; Bai, H.; Brunsteiner, M.; Blond, S. Y.; Petukhov, P. A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4350–4364.
- (12) Leydet, A.; Barragan, V.; Boyer, B.; Montéro, J.-L.; Roque, J.-P.; Witvrouw, M.; Este, J.; Snoeck, R.; Andrei, G.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 342–349.



Synthesis, stereochemical assignment, and bioactivity of the *Penicillium* metabolites penicillenols B₁ and B₂

Karl Kempf^a, Florian Schmitt^a, Ursula Bilitewski^b, Rainer Schobert^{a,*}

^a Organic Chemistry Laboratory, University Bayreuth, Universitätsstr. 30, D-95440 Bayreuth, Germany

^b Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstrasse 7, 38124 Braunschweig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 February 2015

Received in revised form 28 May 2015

Accepted 29 May 2015

Available online 4 June 2015

Keywords:

Penicillenol

Tetramic acids

Antibiotics

Anticancer drugs

ABSTRACT

The *Penicillium* metabolites penicillenols B₁ and B₂ were synthesised for the first time by elimination of a mesylated penicillenol A precursor as obtained from an L-threonine derived tetramic acid. The (Z,S)- and (E,S)-configured diastereomers were identical to the natural compounds as to NMR spectra and optical rotations. Both isomers showed antiproliferative effects against cancer and endothelial cell lines and penicillenol B₁ was also notably antibiotic against *Staphylococcus aureus*.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The penicillenols **1** were isolated from *Penicillium* sp. GQ-7, an endophytic fungus associated with *Aegiceria corniculatum*.¹ They are N-methylated pyrrolidine-2,4-diones (tetramic acids)² bearing an α -methyl branched C₈-fatty acyl residue at C-3 (Fig. 1). The

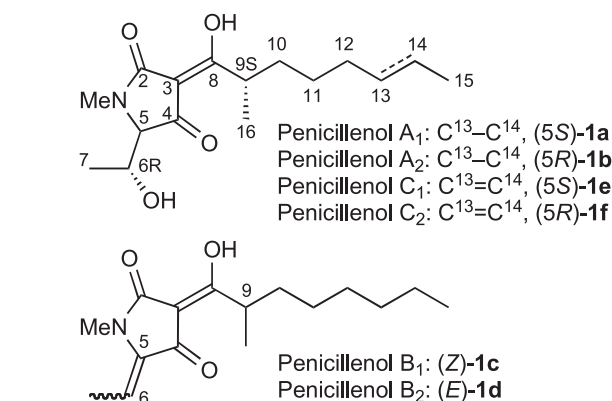


Fig. 1. Structures of penicillenols **1a–f**.

* Corresponding author. Tel.: +49 921 55 2679; fax: +49 921 55 2671; e-mail address: Rainer.Schobert@uni-bayreuth.de (R. Schobert).

penicillenols A₁ **1a** and A₂ **1b** were synthesised by Yoda et al. via cyclisation of N,O-protected L-threonine and D-allo-threonine, respectively, with Meldrum's acid and subsequent 3-acylation of the so-formed tetramic acids.³ Our group reported the synthesis of penicillenol C₁ **1e** via Wittig cyclisation of a protected benzyl L-N-methylthreoninate with the phosphorus ylide Ph₃PCCO **2**.⁴ In either case the comparison of the NMR and optical rotation data of the synthetic products allowed the configurational assignment of the natural products. In contrast, the penicillenols B₁ **1c** and B₂ **1d**, which are formal dehydration products of penicillenol A have neither been synthesised nor had their configuration at C-9 been assigned.

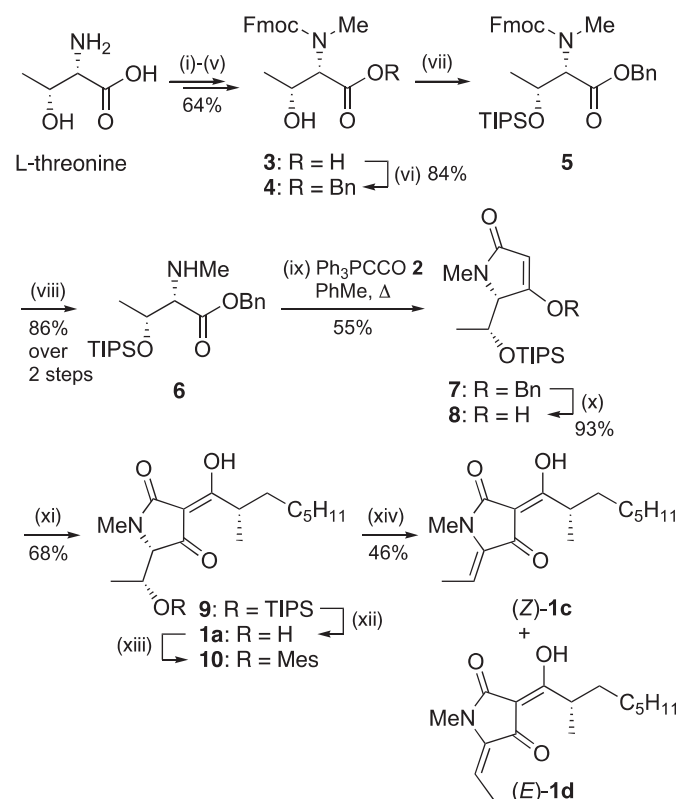
Herein we report the first synthesis of **1c** and **1d** employing an alternative third route to the threonine derived tetramic acid core, and the assignment of the configuration of C-9 of the natural penicillenols B₁ and B₂. Since they had shown antiproliferative activity against HL-60 leukaemia with single-digit micromolar IC₅₀ values we also assessed their efficacy against further cancer and endothelial cell lines. As a first test for antibiotic activity we measured their dose-dependent effects on *Staphylococcus aureus*.

2. Results and discussion

In our previous synthesis of **1e** we prepared the N-methylated and O-TIPS protected benzyl threoninate **6**, required for the cyclisation with ylide Ph₃PCCO **2** to give tetramic acid **8**, from L-threonine in seven steps, which included N-nosylation to enable N-mono-methylation.⁴ Although we still deem this a viable approach,

we now explored a new strategy for the synthesis of ester **6** that achieves *N*-mono-methylation without preceding nosylation. The yield of this route to **6** is higher (46%) than that of the previous one (34%), it is upscalable since its intermediates are easier to purify without columning, and it is more atom-economical. We assumed that the unknown configuration at C-9 of **1c** and **1d** would be *S* as in the case of penicillenols A and C.

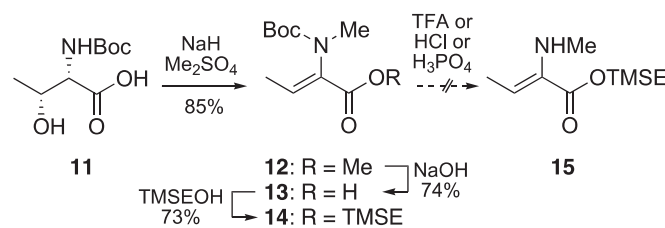
According to literature⁵ *L*-threonine was converted in five steps and 64% yield to its *N*-methyl-*N*-Fmoc derivative **3** (Scheme 1). This sequence was comprised of *O*-acetylation and *N*-Fmoc protection of threonine, a subsequent oxazolidinone formation with para-formaldehyde, and the reduction of the latter to give the *N*-methyl derivative. Hydrolysis left acid **3**, which was esterified with benzyl bromide and Cs_2CO_3 yielding the hitherto unknown ester **4** as colourless crystals in over 80%. *O*-TIPS protection afforded **5**, the Fmoc group of which was removed with piperidine to leave the amino ester **6** in 86% over the last two steps, which can be carried out in one pot. Refluxing amino ester **6** with ylide **2** in toluene gave benzyl tetramate **7** in 55% yield via a domino sequence comprised of amine addition to the C=C bond of **2** followed by an intramolecular Wittig olefination of the so-formed amide ylide. Hydrogenolysis of **7** led to tetramic acid **8**, which was 3-acylated according to the Yoda protocol³ with *S*-2-methyloctanoic acid⁶ prepared by α -methylation of octanoic acid using an Evans auxiliary. Pure tetramic acid **9** was obtained in 68% yield upon chromatography of the crude on a reversed stationary phase (Merck LiChrorep RP-18). Its desilylation with 70% HF/pyridine and subsequent purification by another RP column chromatography furnished penicillenol A₁ **1a** in 88% yield. Mesylation of the 6-OH of **1a**



Scheme 1. Reagents and conditions: (i) 28 equiv AcCl/AcOH , 6 N HCl 1:1, 0 °C, 45 min; (ii) FmocONSu , NEt_3 , dioxane/THF 1:1, 12 h, rt; (iii) $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n$, $p\text{TsOH}$, toluene, 1 h, refl.; (iv) AlCl_3 , Et_3SiH , CH_2Cl_2 , 4 h, rt; (v) dioxane/2 M aq HCl 1:1, 60 °C, 12 h; (vi) Cs_2CO_3 , BnBr , rt; (vii) TIPSOTf , NEt_3 , 12 h, 0 °C; (viii) 20% piperidine, CH_2Cl_2 ; (ix) 1.2 equiv **2**, toluene, refl., 16 h; (x) 1 bar H_2 , Pd/C, MeOH; (xi) *S*-2-methyloctanoic acid, 1.2 equiv EDC, 0.2 equiv DMAP, CH_2Cl_2 , 12 h, rt, then 1.5 equiv CaCl_2 , 1.5 equiv NEt_3 , rt, 12 h, then 3.5 h refl.; (xii) 8 equiv HF/pyridine (88%), THF; (xiii) 2 equiv MesCl , 4 equiv NEt_3 , 0.4 equiv DMAP; (xiv) THF, 0.1 N NaOH 2:1, rt.

gave **10**, which was treated overnight with 0.1 N aqueous NaOH/THF to give a 3:1 mixture of both penicillenols B. It was base-line separated on a prep HPLC column (Kinetex 5 μm , C18, 250×21.2 mm) to afford the pure isomers **1c** (35%) and **1d** (11%), each as a 5:6 mixture of two *exo*-enol tautomers.

Originally, we intended to introduce the $\text{C}^5=\text{C}^6$ bond early in the synthesis of penicillenols B to avoid the necessity of protecting the secondary alcohol of threonine. *N*-Boc-*L*-threonine **11** gave the *N*-methylated aminobutenoate **12** in one step and as a 3:1-mixture of *Z*- and *E*-isomers when treated with NaH and Me_2SO_4 (Scheme 2). However, all attempts at cleaving the Boc group to liberate unsaturated amino esters such as **15**, required for the cyclisation with ylide **2**, failed for unknown reasons. So this approach had to be abandoned.



Scheme 2. $\text{TMSE}=\text{Me}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2$.

The configurations of the $\text{C}^5=\text{C}^6$ bond of our synthetic penicillenols B were assigned by NOESY experiments (cf. Supplementary data). For the assignment of the configuration at C-9 of the natural penicillenols B we compared the known chemical shifts in their ^{13}C NMR spectra¹ with those of our synthetic (9*S*)-configured *Z*- and *E*-diastereomers. Table 1 shows a perfect match of indicative carbon signals. The specific rotations of our samples of penicillenols B were $[\alpha]_D^{24} -15$ (c 0.23, MeOH) for **1c** and $[\alpha]_D^{24} -6$ (c 0.13, MeOH) for **1d**, which is the other way round as had been reported in literature¹ (**1c**: $[\alpha]_D^{24} -7.8$; **1d**: $[\alpha]_D^{24} -15.9$). Given the matching NMR spectra, the congruence of the HPLC retention times (*Z*-products eluted first in our hands and in literature), and the fact that **1a** did not racemise under the basic conditions of the final elimination step, we assume a mixing up of samples or data by the isolating group.

This group also reported the cytotoxicities of penicillenols A–C in MTT assays⁷ against four cancer cell lines of which only leukaemia HL-60 responded to penicillenols B. Since these activities lay within the range of clinical applicability we tested **1c** and **1d** for growth inhibition of cells of highly invasive 518A2 melanoma and cisplatin-resistant HT-29 colon carcinoma and of the hybrid endothelial cell line Ea.hy926. Both compounds are equally active and even exceed the effect of cisplatin against HT-29. However, they are still far from clinical usability (Table 2).

The penicillenols B also showed dose-dependent antimicrobial activity against Gram-positive bacteria such as *S. aureus* (Fig. 2) and Gram-negative bacteria such as the export-limited *Escherichia coli* tolC mutant (not shown). Interestingly, penicillenol B₁ was distinctly more active than penicillenol B₂.

3. Conclusion

We reported a new synthetic route to penicillenol A₁ and, by mesylation–elimination of this, also the first access to both penicillenols B₁ and B₂. We assigned the stereochemistry of C-9 in the 3-acyl sidechain as *S*. The penicillenols B were efficacious against two cancer cell lines and they also showed antimicrobial activity against Gram-positive and -negative bacteria. It is worthy of note that penicillenol B₁ was conspicuously more active than its B₂

Table 1Chemical shifts δ^a [ppm] of indicative hydrogen and carbon atoms of natural and synthetic penicillenols **B**₁ and **B**₂

Position	Nat 1c ^a <i>exo</i> ^A / <i>exo</i> ^B	Synt 1c <i>exo</i> ^A / <i>exo</i> ^B	Nat 1d ^a <i>exo</i> ^A / <i>exo</i> ^B	Synt 1d <i>exo</i> ^A / <i>exo</i> ^B
6 (¹ H)	5.89, q, <i>J</i> 7.7	5.87, q, <i>J</i> 8.0	5.38, q, <i>J</i> 7.8	5.38, q, <i>J</i> 7.7
7 (¹ H)	2.03, d, <i>J</i> 8.2	2.01, d, <i>J</i> 8.0	2.23, d, <i>J</i> 7.8	2.23, d, <i>J</i> 7.7
17 (¹ H)	3.39, s	3.37, s	2.99, s	3.04, s
2 (¹³ C)	172.5/165.7	172.5/165.6	170.8/164.0	170.9/164.1
3 (¹³ C)	99.6/101.8	99.5/101.8	101.3/103.7	101.3/103.7
4 (¹³ C)	191.2/197.4	191.1/197.4	190.8/196.6	190.8/196.6
5 (¹³ C)	136.7	136.7	134.2	134.3
6 (¹³ C)	107.5	107.3	111.8	111.8
8 (¹³ C)	181.0/185.0	180.9/184.8	182.8/187.3	183.1/187.3
17 (¹³ C)	27.9	27.8	24.7	24.7/24.9

^a ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ at 150 MHz (natural **1c,d**)¹ and 75 MHz (synthetic **1c,d**). ¹H NMR spectra were recorded in CDCl₃ at 600 MHz (natural **1c,d**)¹ and 300 MHz (synthetic **1c,d**).

Table 2Inhibitory concentrations IC₅₀ (72 h)^a in μ M of penicillenols **B**₁ **1c** and **B**₂ **1d** when applied to 518A2 melanoma, HT-29 colon carcinoma, and Ea.hy926 hybrid endothelial cells

Cell line/compound	518A2	HT-29	Ea.hy926
1c	24.7 \pm 3.1	28.0 \pm 1.1	32.7 \pm 2.2
1d	21.1 \pm 1.3	26.0 \pm 1.8	32.6 \pm 4.0
Cisplatin	9.0 \pm 2.0	>100	—

^a Values are derived from concentration–response curves obtained by measuring the percentage absorbance of viable cells relative to untreated controls (100%) after 72 h exposure in MTT assays. Values represent means of four independent runs \pm SD.

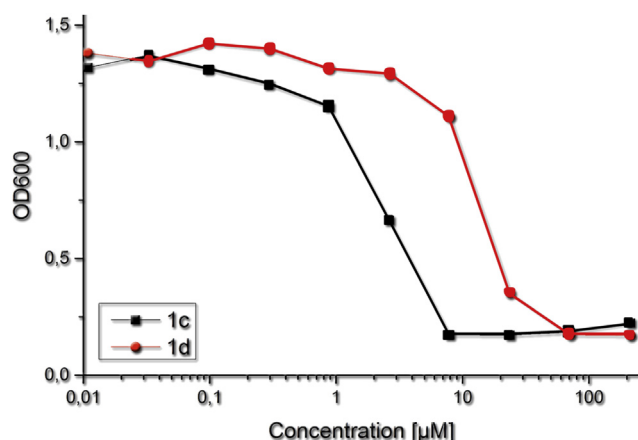


Fig. 2. Dose-dependent antimicrobial effects of penicillenols **B**₁ **1c** and **B**₂ **1d** on *Staphylococcus aureus*. Bacterial growth was measured as ‘turbidity’ (OD at 600 nm). Minimal inhibitory concentrations (MIC) were ca. 8 μ M for **1c** and 70 μ M for **1d**.

congener against the bacteria selected by us. A more comprehensive screening for antimicrobial activity is currently underway.

4. Experimental

4.1. General

Melting points (uncorrected): Büchi melting point apparatus M-565. IR: Perkin–Elmer Spectrum 100 FT-IR spectro-photometer with ATR sampling unit. NMR: if not indicated otherwise, measured in CDCl₃ at 300 MHz (¹H) or 75.5 MHz (¹³C) on a Bruker Avance 300 spectrometer. Chemical shifts are given in parts per million (δ) downfield from Me₄Si as internal standard for ¹H and ¹³C. Mass spectra: Finnigan MAT 8500 (EI, 70 eV). HRMS: UPLC/Orbitrap MS system in ESI mode. Optical rotations: Perkin–Elmer Polarimeter 343 (λ =589 nm). For column chromatography Merck silica gel 60

(230–400 mesh) or Merck LiChrorep RP-18 (40–63 μ m) was used. HPLC columns: Phenomenex Kinetex 5 μ C18 250 \times 4.6 mm, flow rate 0.7 mL/min (analyt.) and 250 \times 21.2, 14.9 mL/min (prep.). Solvents were dried and distilled (diethyl ether, toluene and THF over Na, CH₂Cl₂ over CaH₂) and stored under an atmosphere of dry argon. Starting compounds were bought from the usual sources and used without further purification. For the synthesis of compounds **12**–**14** see [Supplementary data](#).

4.2. Syntheses and characterisation

4.2.1. Benzyl (2S,3R)-N-[(9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]-N-methyl-threoninate (4). Analogously to a general protocol⁸ a solution of *N*-Fmoc-*N*-methyl-L-threonine (**3**)⁵ (6.90 g, 19.5 mmol) in methanol (100 mL) was treated with Cs₂CO₃ (3.25 g, 10.0 mmol) and stirred at room temperature until it had completely dissolved. The solvent was evaporated and the remainder was suspended twice in CHCl₃ and evaporated each time under reduced pressure to remove residual water. The resulting solid was treated with DMF (300 mL) and benzylbromide (2.6 mL, 22.0 mmol) and the mixture thus obtained was vigorously stirred for 12 h and then evaporated under reduced pressure. The residue was partitioned between diethyl ether and water, the aqueous phase was extracted twice with diethyl ether, and the combined organic layers were finally washed with brine, dried over Na₂SO₄, and evaporated in vacuum. The crude product was purified by column chromatography (silica gel; hexane/ethyl acetate, 10:1 to 3:1) to afford ester **4** (7.25 g, 16.3 mmol, 84%) as white needles of mp 91 °C; *R*_f 0.20 (hexane/ethyl acetate, 3:1); [α]_D²⁰ –2.0 (c 1.00, CH₂Cl₂); ν_{\max} 3481, 3035, 2961, 1742, 1699, 1479, 1451, 1401, 1373, 1308, 1236, 1195, 1146, 1104, 1035, 988, 879, 757, 738, 697 cm^{–1}; δ_{H} (CDCl₃) 1.22 (3H, d, *J*_{HH} 6.5 Hz, CCH₃), 3.02 (3H, s, NCH₃), 4.27 (1H, t, *J*_{HH} 7.0 Hz, FmocCH), 4.45 (2H, d, *J*_{HH} 7.0 Hz, FmocCH₂), 4.50 (1H, dq, *J*_{HH} 4.9, 6.5 Hz, 3-H), 4.66 (1H, d, *J*_{HH} 4.9 Hz, 2-H), 5.19 (1H, d, *J*_{HH} 12.4 Hz, CHH^aPh), 5.26 (1H, d, *J*_{HH} 12.4 Hz, CHH^bPh), 7.29–7.37 (7H, m, ArH), 7.41 (2H, t, *J*_{HH} 7.4 Hz, FmocArH), 7.60 (2H, d, *J*_{HH} 7.4 Hz, FmocArH), 7.78 (2H, d, *J*_{HH} 7.7 Hz, FmocArH); δ_{C} (CDCl₃) 19.5 (C-4), 33.9 (NMe), 47.1 (FmocCH), 64.7 (C-2), 67.0 (CH₂Ph), 67.1 (C-3), 67.9 (FmocCH₂), 119.8, 124.9, 126.9, 127.6, 128.1, 128.3, 128.5, 135.2, 141.2, 143.7, 157.5, 169.8. HRMS: *m/z* calcd for [M+H, C₂₇H₂₈NO₅⁺]: 446.19620; found: 446.19553.

4.2.2. Benzyl (2S,3R)-N-methylthreoninate (6). A solution of benzyl *N*-Fmoc-*N*-methyl-threoninate **4** (2.98 g, 6.7 mmol) in 60 CH₂Cl₂ (60 mL) was kept under argon atmosphere at 0 °C and treated with NEt₃ (1.1 mL, 810 mg, 8.0 mmol) and triisopropylsilyltriflate (1.98 mL, 2.25 g, 7.4 mmol). The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred until the reaction was complete by TLC (hexane/ethyl acetate, 3:1). The solution was cooled to 0 °C, treated with piperidine (18 mL), stirred for 10 min at 0 °C, and

eventually concentrated in vacuo at 25 °C. The remaining piperidine solution was immediately loaded onto a column and separated (silica gel; hexane/ethyl acetate, 20:0 to 20:1) to afford ester **6** (2.16 g, 5.7 mmol, 86% after two steps) as a colourless oil. R_f =0.63 (cyclohexane/EtOAc, 2:1, +1% NEt_3). $[\alpha]_D^{20}$ 2.2 (c 1.00, CH_2Cl_2); ν_{max} 2942, 2895, 2866, 1742, 1732, 1463, 1456, 1373, 1212, 1152, 1124, 1099, 1060, 1014, 998, 967, 949, 918, 882, 746, 733, 696, 676 cm^{-1} ; δ_{H} (CDCl_3) 0.95–1.07 (21H, m, TIPS), 1.26 (3H, d, J_{HH} 6.3 Hz, CCH_3), 1.71 (1H, br s, NH), 2.40 (3H, s, NCH_3), 3.14 (1H, J_{HH} 3.6 Hz, CHN), 4.32 (1H, qd, J_{HH} 6.3, 3.6 Hz, CHCH_3), 5.10 (1H, d, J_{HH} 12.2 Hz, $\text{CH}_2^{\text{a}}\text{Ph}$), 5.22 (1H, d, J_{HH} 12.2 Hz, $\text{CH}_2^{\text{b}}\text{Ph}$), 7.27–7.40 (5H, m, ArH); δ_{C} (CDCl_3) 12.6 (SiCH_3), 18.0 ($\text{SiCCH}_3^{\text{a}}$), 18.1 ($\text{SiCCH}_3^{\text{b}}$), 20.5 (CHCH_3), 35.3 (NMe), 66.4 (CH_2), 69.4 (CHCH_3), 69.9 (CHN), 128.2 (ArH), 128.4 (ArH), 128.5 (ArH), 135.8 (ArC^{q}), 173.3 (CO).

4.2.3. 3-[1'-Hydroxy-(2'S)-methyl-oct-1'-ylidene]-(5S)-[(1'R)-triisopropylsilyloxy-ethyl]-1-methylpyrrolidine-2,4-dione (9). To a solution of (S)-2-methyloctanoic acid⁶ (0.33 g, 2.1 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) at room temperature were added EDC·HCl (0.48 g, 2.5 mmol), tetramic acid **8**⁴ (0.55 g, 1.75 mmol), and DMAP (0.05 g, 0.4 mmol), and the resulting mixture was stirred for 12 h. NEt_3 (0.62 mL, 4.5 mmol) and dry CaCl_2 (0.29 g, 2.6 mmol) were added and stirring was continued for 24 h. After dilution with 20 mL of CH_2Cl_2 the organic phase was washed with 1 M NaHSO_4 and 0.05 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ solutions. The aqueous phases were re-extracted with CH_2Cl_2 and the combined organic layers were dried and concentrated in vacuum. The crude product was purified by a reversed phase silica gel column (22×1.2 cm, rinsing with 85% MeOH, then elution with 100% MeOH) to afford 540 mg (1.19 mmol, 68%) of **9** as a red oil (analytic HPLC: 85% MeOH, after 15 min in 10 min to 100% with 0.1% HCOOH in the water fraction; t_{R} of product (3-acyl tetramic acid): 31.2 min, λ_{max} =285 nm; t_{R} of 4-O-acyl tetramate: 29.5 min, λ_{max} =226 nm); $[\alpha]_D^{20}$ –39.1 (c 1.00, MeOH); ν_{max} 2930, 2867, 1710, 1652, 1615, 1463, 1376, 1328, 1262, 1214, 1139, 1096, 1069, 999, 971, 922, 882, 797, 755, 703, 677 cm^{-1} ; δ_{H} (CDCl_3) 0.84 (3H, t, J_{HH} 6.6 Hz, CH_2CH_3), 0.96–1.01 (21H, m, TIPS), 1.11 (3H, d, J_{HH} 6.7 Hz, C-16), 1.19–1.31 (8H, m), 1.40–1.50 (1H, m, 10-H^a), 1.43 (3H, d, J_{HH} 6.9 Hz, C-7), 1.59–1.70 (1H, m, 10-H^b), 3.10 (3H, s, NMe), 3.47 (1H, d, J_{HH} 1.6 Hz, 5-H), 3.57 (1H, ddqu, J_{HH} 6.3, 1.9, 6.7 Hz, 9-H), 4.56 (1H, dq, J_{HH} 1.6, 6.9 Hz, 6-H); δ_{C} (CDCl_3) 12.6 (SiCH_3), 14.0 (C-15), 16.7 (C-16), 17.9 (SiCCH_3), 22.5 (CH_2), 22.9 (CHCH_3), 27.1 (CH_2), 29.0 (NMe), 29.2 and 31.6 (CH_2), 34.0 (C-10), 35.8 (C-9), 68.0 (CHCH_3), 72.4 (C-5), 101.1 (C-3), 174.4 (CON), 190.6, 193.2. MS (EI), m/z (%): 410 (100) $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{NO}_4\text{Si}^+$, 366 (27), 253 (29) $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_3^+$, 201 (28) $\text{C}_{11}\text{H}_{25}\text{OSi}^+$, 157 (24). HRMS: m/z calcd for $[\text{M}+\text{H}, \text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{NO}_4\text{Si}^+]$: 453.3347, found: 453.3341.

4.2.4. Penicillenol B₁, (5Z,2'S)-5-ethylidene-3-(1-hydroxy-2-methyloct-1-ylidene)-1-methylpyrrolidine-2,4-dione (1c) and penicillenol B₂, (5E,2'S)-5-ethylidene-3-(1-hydroxy-2-methyloct-1-ylidene)-1-methylpyrrolidine-2,4-dione (1d). Penicillenol A₁ (310 mg, 1.04 mmol; for its synthesis, data, and spectra cf. Supplementary data) was dissolved in THF, treated with NEt_3 (580 μL , 4.2 mmol, 4 equiv), methanesulfonylchloride (170 μL , 4.2 mmol, 4 equiv), and DMAP (51 mg, 0.4 mmol, 0.4 equiv) and stirred for 12 h. The mixture was poured into water, acidified with NaHSO_4 and extracted three times with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated in vacuum to leave crude product **10**. It was dissolved in THF (60 mL), 0.1 N aqueous NaOH (30 mL) was added, and the resulting solution was stirred at room temperature for 3 d. NaHSO_4 was added, the resulting mixture was extracted three times with ethyl acetate, and the organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and evaporated in vacuum. The remainder was purified by HPLC (70% MeOH/0.1% HCOOH) to afford 100 mg

(0.35 mmol, 35% over two steps) of penicillenol B₁ as a red oil in the first fraction and 29 mg (0.17 mmol, 11% over two steps) of penicillenol B₂ in the second fraction. Analytic HPLC: elution with 85% MeOH/0.1% HCOOH for 10 min, then gradient rise to 95% MeOH within 3 min; t_{R} of **1c**: 16.3 min, λ_{max} =270 nm, t_{R} of **1d**: 17.8 min, λ_{max} =270 nm.

4.2.4.1. Penicillenol B₁ (1c). $[\alpha]_D^{24}$ –15 (c 0.23, MeOH); ν_{max} 2927, 2857, 1705, 1676, 1610, 1450, 1407, 1370, 1341, 1322, 1239, 1217, 1170, 1111, 1093, 1031, 997, 903, 826, 789, 726, 618, 584, 574, 562 cm^{-1} ; δ_{H} (CDCl_3 , 6:5 mixture of tautomer^a and tautomer^b) 0.79–0.89 (3H, m, 15-H), 1.15 (3H, d, J_{HH} 6.9 Hz, 16-H), 1.19–1.33 (8H, m, $\text{CH}_2^{\text{a/b}}$), 1.38–1.52 (1H, m, 10-H), 1.60–1.75 (1H, m, 10-H), 2.01 (3H, d, J_{HH} 8.0 Hz, 7-H^a), 2.07 (3H, d, J_{HH} 8.0 Hz, 7-H^b), 3.34 (3H, s, NMe^b), 3.37 (3H, s, NMe^a), 3.62–3.75 (1H, m, 9-H), 5.85 (1H, q, J_{HH} 8.0 Hz, 6-H^a), 5.87 (1H, q, J_{HH} 8.0 Hz, 6-H^b); δ_{C} (CDCl_3) 11.4 (C-7^a), 11.8 (C-7^b), 14.0 (C-15^{a/b}), 17.0 (C-16^b), 17.2 (C-16^a), 22.5 (C-13^{a/b}), 27.1 (C-11), 27.8 (C-17), 29.2 (C-12^a), 29.25 (C-12^b), 31.6 (C-14), 33.3 (C-10^b), 33.7 (C-10^a), 35.8 (C-9^a), 37.4 (C-9^b), 99.5 (C-3^a), 101.8 (C-3^b), 107.3 (C-6^a), 108.1 (C-6^b), 134.4 (C-5^b), 136.7 (C-5^a), 165.6 (C-2^b), 172.5 (C-2^a), 180.9 (C-8^a), 184.8 (C-8^b), 191.1 (C-4^a), 197.4 (C-4^b); MS (EI), m/z (%) 279 (95, M^+), 251 (7), 232 (8), 222 (12), 208 (76), 195 (99), 177 (16), 166 (100), 139 (42), 127 (4), 113 (6), 86 (15), 70 (30), 57 (25), 44 (21); HRMS: m/z calcd for $[\text{M}+\text{H}, \text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}_3^+]$: 280.19072, found: 280.19022.

4.2.4.2. Penicillenol B₂ (1d). $[\alpha]_D^{24}$ –6 (c 0.13, MeOH); ν_{max} 2928, 2858, 2043, 2003, 1703, 1671, 1615, 1445, 1398, 1374, 1341, 1315, 1278, 1206, 1164, 1091, 1050, 883, 826, 802, 726, 681, 606, 584, 573 cm^{-1} ; δ_{H} (CDCl_3 , 6:5 mixture of tautomer^a and tautomer^b) 0.81–0.90 (3H, m, 15-H), 1.19 (3H, d, J_{HH} 7.0 Hz, 16-H), 1.22–1.29 (8H, m, $\text{CH}_2^{\text{a/b}}$), 1.42–1.51 (1H, m, 10-H), 1.65–1.75 (1H, m, 10-H), 2.23 (3H, d, J_{HH} 7.7 Hz, 7-H^{a+b}), 3.04 (3H, s, NMe^b), 3.05 (3H, s, NMe^a), 3.70 (1H, pseudo-sxt, J_{HH} 7.0 Hz, 9-H), 5.38 (1H, q, J_{HH} 7.7 Hz, 6-H^a), 5.46 (1H, q, J_{HH} 7.7 Hz, 6-H^b); δ_{C} (CDCl_3) 11.8 (C-7^a), 12.4 (C-7^b), 14.0 (C-15^{a/b}), 17.0 (C-16^b), 17.2 (C-16^a), 22.6 (C-13^{a/b}), 24.7 (C-17^a), 24.9 (C-17^b), 27.2 (C-11^{a/b}), 29.3 (C-12^{a/b}), 31.6 (C-14^{a/b}), 33.6 (C-10^{a/b}), 35.7 (C-9^a), 37.1 (C-9^b), 101.3 (C-3^a), 103.7 (C-3^b), 111.8 (C-6^a), 112.6 (C-6^b), 134.3 (C-5^a), 136.0 (C-5^b), 164.1 (C-2^b), 170.9 (C-2^a), 183.1 (C-8^a), 187.3 (C-8^b), 190.8 (C-4^a), 196.6 (C-4^b); m/z (%) 279 (99, M^+), 251 (7), 232 (8), 222 (12), 208 (66), 195 (99), 177 (15), 166 (100), 139 (35), 113 (4), 85 (7), 70 (24), 57 (14), 44 (13); HRMS: m/z calcd for $[\text{M}+\text{H}, \text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}_3^+]$: 280.19072, found: 280.19040.

4.3. Cell cultures and growth inhibition (MTT) assay

4.3.1. Cell cultures. The human 518A2 melanoma cells (Department of Radiotherapy and Radiobiology, University Hospital Vienna)⁹ and the human colon adenocarcinoma cell line HT-29 (DSMZ no.: ACC 299) were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) or Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium (HT-29), supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 1% antibiotic-antimycotic solution (all from Gibco) and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin (SERVA). The endothelial hybrid cell line Ea.hy926 (ATCC no.: CRL-2922)¹⁰ was grown in conditioned DMEM with an endothelial medium supplement (PAA/GE Healthcare) added. The cells were maintained in a moisture-saturated atmosphere (5% CO_2 , 95% humidity) at 37 °C.

4.3.2. MTT assay.⁷ MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium hydrobromide; ABCR] was used to identify the metabolic activity of vital cells, which are capable of reducing it to a violet formazan. 518A2, HT-29, and Ea.hy926 cells ($5 \times 10^4/\text{mL}$) were seeded and cultured for 24 h in 96-well microplates. Incubation of cells following treatment with the test

compounds was continued for 72 h. Blank and solvent controls were treated identically. Then, MTT in phosphate-buffered saline was added to a final concentration of 0.05% (518A2, Ea.hy926) or 0.1% (HT-29). After 2 h the precipitate of formazan was dissolved in DMSO containing 10% sodium dodecylsulfate. The microplates were swiftly turned to discard the medium before adding the solvent mixture. The microplates were gently shaken in the dark for 30 min and absorbances at 570 nm and 630 nm (background) were measured with a Tecan F-200 plate reader. All experiments were carried out in quadruplicate, and the percentage of the viable cells was calculated with Origin 8.1G as the mean \pm standard deviation relative to the control (100%).

4.4. Antibacterial activity test

S. aureus (NCTC 8325) was cultivated in T-medium, which was composed of tryptone (LP 0042, 17 g/L), neutralised soya peptone (LP 0044, 3 g/L), NaCl (0.1 M), KCl (2 mM), MOPS (50 mM), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2 mM) and glucose (1%). Medium (200 mL) was inoculated with an *S. aureus* colony and incubated at 37 °C with shaking overnight. An aliquot of the overnight culture was diluted with fresh T-medium to obtain 50 mL with a start OD_{600} of 0.01. This culture was allowed to grow for another 3 h at 37 °C. The resulting culture was added to the wells of a transparent 96-well microtiter plate containing diluted DMSO solutions of the test compounds. The total volume in each plate was 180 μL . The bacteria were incubated with the compounds at 37 °C for 21 h. Bacterial growth was followed via determination of the optical density (OD) at 600 nm (turbidity). Blank and solvent controls were included on the microtiter plate.

Supplementary data

Syntheses and data of compounds **1a**, **12**, and **14**; NMR spectra of **1a**, **1c**, **1d**, **4**, **6**, **9**, **12**, and **14**. Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2015.05.116>.

References and notes

1. Lin, Z.-J.; Lu, Z.-Y.; Zhu, T.-J.; Fang, Y.-C.; Gu, Q.-Q.; Zhu, W.-M. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 217–221.
2. Reviews on tetramic acids: (a) Henning, H.-G.; Gelbin, A. *Adv. Heterocycl. Chem.* **1993**, *57*, 139–185; (b) Royle, B. J. L. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1981–2001; (c) Ghisalberti, E. L. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Atta-ur-Rahman, Ed.; Elsevier: 2003; Vol. 28/1, pp 109–163; (d) Gossauer, A. Monopyrrolic natural compounds including tetramic acid derivatives In Herz, W., Falk, H., Kirby, G. W., Eds., *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Springer: Wien, Germany/ New York, NY, 2003; Vol. 86; 53–58 and 86–93 and 131–140; (e) Schobert, R. *Naturwissenschaften* **2007**, *94*, 1–11; (f) Schobert, R.; Schlenk, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4203–4221.
3. (a) Ujihara, Y.; Nakayama, K.; Sengoku, T.; Takahashi, M.; Yoda, H. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5142–5145; (b) Sengoku, T.; Wierzejska, J.; Takahashi, M.; Yoda, H. *Synlett* **2010**, 2944–2946; (c) Sengoku, T.; Nagae, Y.; Ujihara, Y.; Takahashi, M.; Yoda, H. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4391–4401.
4. Kempf, K.; Raja, A.; Sasse, F.; Schobert, R. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 2455–2461.
5. Bahekar, R. H.; Jadav, P. A.; Patel, D. N.; Prajapati, V. M.; Gupta, A. A.; Jain, M. R.; Patel, P. R. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5003–5005.
6. Kumagai, A.; Nagaoka, Y.; Obayashi, T.; Terashima, Y.; Tokuda, H.; Hara, Y.; Mukainaka, T.; Nishino, H.; Kuwajima, H.; Uesato, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 5143–5148.
7. Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
8. Cohen, S. B.; Halcomb, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2534–2543.
9. Jansen, B.; Schlagbauer-Wadl, H.; Eichler, H.-G.; Wolff, K.; van Elsas, A.; Shrier, P. I.; Pehamberger, H. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 362–365.
10. Edgell, C. J.; McDonald, C. C.; Graham, J. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 3734–3737.

Syntheses of Decalinoyltetramic Acids

Methiosetin and TA-289: Stereocontrolled IMDA Reactions of Metal Chelated 3-Trienoyltetramates

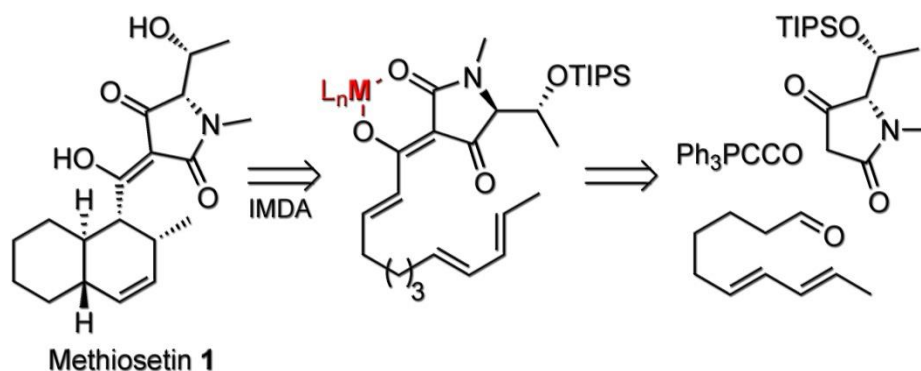
Markus Winterer[☺], Karl Kempf[☺], and Rainer Schobert*

[☺]these authors contributed equally to this work

Organic Chemistry Laboratory, University Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany

Rainer.Schobert@uni-bayreuth.de

RECEIVED



Two related decalinoyl tetramic acids were synthesized for the first time by two different strategies, one using an early and the other a late stage cyclization to afford the decalin moiety. In the case of the late stage intramolecular Diels-Alder (IMDA) cyclization the choice of the Lewis acidic metal catalyst was crucial for the formation of only one major diastereomer of methiosetin **1** via stereoinduction by the metal chelate.

Keywords: Methiosetin, TA-289, decalinoyl tetramic acid, intramolecular Diels-Alder reaction.

Introduction

(+)-Methiosetin **1** is a 3-decalinoyltetramic acid¹⁻³ with antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* which was isolated in 2011 by Singh *et al.*⁴ from a sooty mold *Capnodium* sp. However, the absolute configuration of the two stereocenters C-5' and C-6' (*cf* Scheme 1 for atom numbering) could not be assigned. More recently, a related tetramic acid, TA-289 **2**, was isolated by Atkinson *et al.* from an unidentified *Fusarium* sp. fungus.⁵ It shares the decalin moiety with methiosetin, yet features a pyrrolidinone derived from alanine rather than threonine. We now undertook the first syntheses of both congeners on different routes.

The majority of 3-decalinoyltetramic acids were hitherto prepared by assembling the *trans*-decalin by an intramolecular Diels-Alder (IMDA) reaction using auxiliaries or chiral catalysts for stereocontrol. The tetramate ring was established either prior to or following this IMDA cyclization. For instance, Gao *et al.*⁶ prepared cryptocin and derivatives of equisetin and fusarisetin A by generating the tetramic acid according to Ley *et al.*^{7,8} via aminolysis of a β -keto thioester, linked to the full-fledged decalin, with the respective amino ester, followed by a basic Dieckmann condensation of the resulting *N*- β -keto amino ester. Similarly, Opatz *et al.* synthesized hymenosetin by first establishing an enantiopure decalin aldehyde by IMDA reaction of a trienal derived from (+)-citronellal, followed by attachment of an *N*- β -ketoacylthreoninate and its Lacey-Dieckmann condensation.⁹ In contrast, Westwood and Healy prepared diastereomeric mixtures of JBIR-22 by first attaching a trienoyl residue to a tetramic acid via a HWE olefination and then initiating the IMDA of this residue with an external magnesium bisoxazoline complex as a catalyst.¹⁰ A third conceivable approach to 3-decalinoyltetramic acids is the attachment of a decalinoic acid to the respective pre-formed tetramic acid by means of condensation agents such as DCC/DMAP (Yoshi¹¹-Yoda¹² acylation) or BF₃ etherate (Jones acylation).¹³ However, neutral condensation agents usually

lead to formation of 4-*O*-decalinoyltetramic acids which are difficult to rearrange to the 3-decalinoyltetramates, and BF₃ etherate may lead to racemization at C-2 or C-5'.

Herein, we describe two new approaches to 3-decalinoyltetramic acids. The first one utilizes the attachment of an unsaturated aldehyde to a tetramic acid bearing a 3-acyl ylide¹⁴ via a Wittig reaction, followed by an IMDA cyclization of the unsaturated side chain which is stereocontrolled not by an external catalyst, as in the strategy of Westwood and Healy, but by a metal chelate complex of the tetramic acid itself. The second approach employs a 3-acylation of an enantiopure tetramic acid with an enantiopure decalinoyl chloride according to Jones, performed under milder than usual conditions.

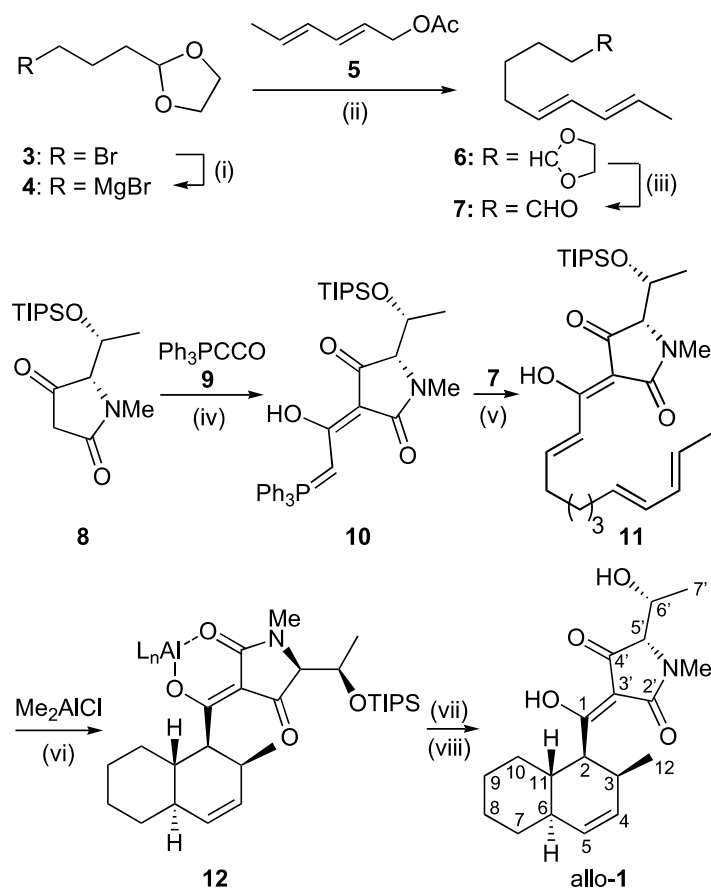
Results and Discussion

Synthesis of methiosetin

We intended to first attach a 3-trienoyl residue to an enantiopure tetramic acid and then establish the decalin system via an IMDA reaction stereocontrolled by the tetramate moiety. To this end, TIPS-protected L-threonine-derived tetramic acid **8** was prepared as previously reported^{15,16} and acylated with the cumulated phosphorus ylide Ph₃PCCO **9**^{14,17} to give the stabilized ylide **10** in quantitative yield (Scheme 1). The latter was deprotonated with KO^{*t*}Bu to afford an anionic ylide species that underwent an (*E*)-selective olefination when treated with decadienal **7** to give the immediate IMDA precursor **11** in 81% yield. The aldehyde **7** was synthesized in analogy to a method by Paintner *et al.*¹⁸ starting with a copper-mediated coupling reaction between the Grignard derivative **4** of commercially available 2-(3-bromopropyl)-1,3-dioxolane **3** and (*E2,E4*)-hexadienyl acetate **5**. By replacing Paintner's Li₂CuCl₄ with CuBr(Me₂S) we increased the yield of product dioxolane **6** by 10% to 78%. Its deprotection gave deca-6,8-dienal **7** in near-quantitative yield. An attempt to cyclize the IMDA precursor **11** in the presence of borontrifluoride etherate led to undesired products, presumably due to deprotection and elimination reactions. However, the use of two equiv of

Me_2AlCl as a catalyst gave, after demetalation and deprotection, one predominant stereoisomer of methiosetin **1** in 29% yield aside of separable trace amounts of a second one. The excess of the metal catalyst was necessary since 3-acyltetramic acids form chelate complexes with a broad range of metals, including aluminum.¹⁹ The predominance of one stereoisomer may be rationalized by the influence of the bulky TIPS-group near the two stereocenters C-5' and C-6' in an almost planar aluminum 3-acyltetramic acid chelate complex intermediate of unknown structure. For the removal of the chelated aluminum in the presumed product complex **12**, the crude product was treated first with $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$ to substitute the metal for BF_2 and then with hot methanol to liberate the 3-acyltetramic acid **1**. Gratifyingly, the treatment with $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$ led to a swift cleavage of the TIPS protecting group but not to an undesired subsequent elimination of water.

SCHEME 1.^a Synthesis of *Allo*-Methiosetin **1 via a Late Stage IMDA Reaction.**



^a Reagents and conditions: (i) Mg, THF, 30 °C, 1.5 h; (ii) 0.25 equiv CuBr(Me₂S), −40 °C (3 h) → rt, 12 h, 78%; (iii) AcOH/THF/H₂O, 90 °C, 1.5 h, 97%; (iv) **9**, THF, reflux, 12 h, 99%; (v) CH₂Cl₂, KO^tBu, then **7**, r.t., 12 h, 81%; (vi) 2 equiv Me₂AlCl, CH₂Cl₂, r.t., 3 d; (vii) BF₃×Et₂O, CH₂Cl₂, r.t., 12 h; (viii) MeOH, reflux, 2 h, 29% (over 3 steps).

The purified methiosetin isomer thus obtained showed a specific optical rotation of $[\alpha]^{24}_{\text{D}} -107$ (*c* 0.82, MeOH) while the isolated natural product had $[\alpha]^{23}_{\text{D}} +12.4$ (*c* 0.97, MeOH).

The published ¹H-NMR spectra of natural methiosetin **1** and that of our synthetic sample were in perfect agreement when measured in methanol-*d*₄, yet differed somewhat when recorded in CDCl₃. The ¹³C-NMR shifts differed by more than 0.2 ppm only for carbon atoms 11, 4', and 5' (*cf* the Supporting Information, Tables S1 and S2). Our synthetic *allo*-methiosetin stereoisomer most likely features a decalinoyl moiety which is the enantiomer of that of the natural product since the IMDA reaction can afford only two *endo*-diastereomers¹⁰ and because an inversion at C-5' to a formal D-threonine configuration in the course of the synthesis is rather unlikely. A conceivable explanation for this stereo induction in the "wrong"

way, i.e., affording *allo*-methiosetin rather than methiosetin, is offered by the fact that 3-acyltetramic acids can form metal chelate complexes by engaging the exocyclic enol OH-group at C-1 and either the 4'-keto or the amide 2'-carbonyl group of the heterocycle, depending on the metal. Both types of chelate complexes are distinguishable by analyzing the 1700–1500 cm⁻¹ carbonyl region of their IR spectra.^{20,21} The IR spectrum of the aluminum complex **12**, recorded immediately after the IMDA reaction, showed bands at 1694 and 1599 cm⁻¹, typical of metal coordination by the amide carbonyl (Fig. 0).

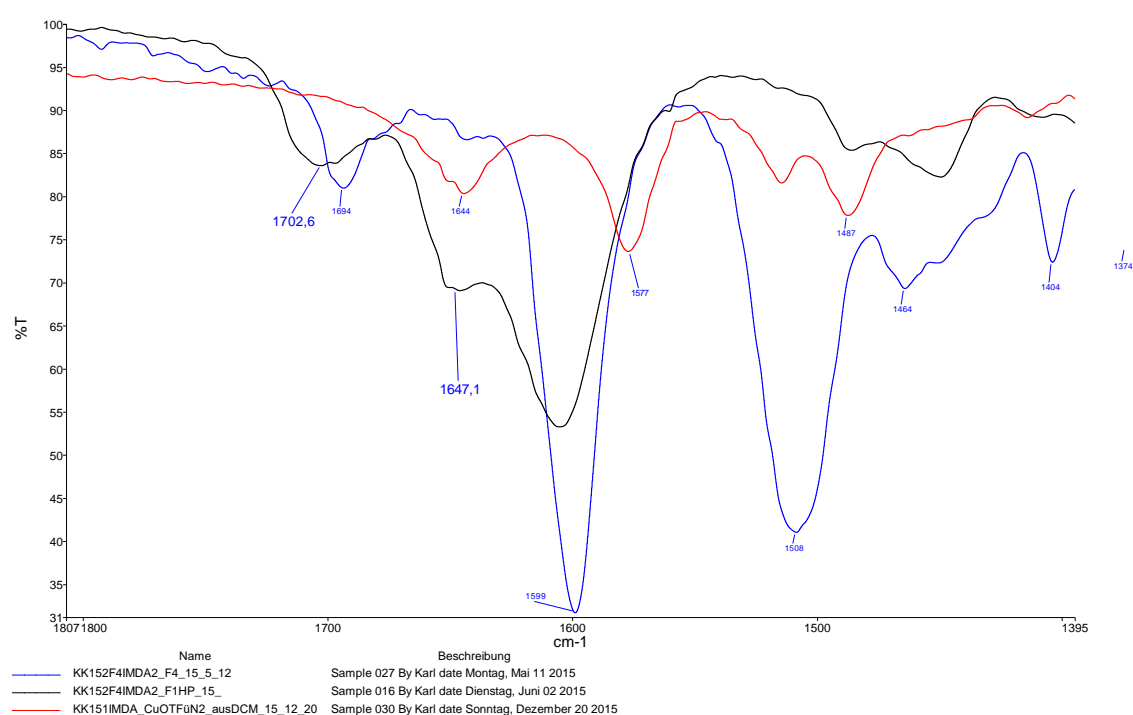


Fig. 0: Carbonyl region of the IR- spectra of IMDA-precursor **11** (black), and its aluminium complex (blue) showing the absence of the amide carbonyl band involved in complexation, and its copper complex (red), showing the absence of the ketone carbonyl band.

It is reasonable that the same sort of aluminum coordination by the IMDA precursor **11** directed the cyclization toward formation of the *allo*-isomer. Since we had previously observed that 3-acyltetramic acids coordinate to other metals, such as magnesium, via their exocyclic enol OH-group and their 4'-keto oxygen, we also conducted the IMDA reaction of **11** in the presence of other metal catalysts (Fig. S1, Table S3). Cu(OTf)₂ and La(NO₃)₃ led to products whose IR-spectra suggested selective ketone complexation. Unfortunately, with

these catalysts the cyclisation proceeded only sluggishly and with concomitant TIPS deprotection, so that no enrichment of one stereoisomer could be obtained. It would be worth trying other bulky protective groups such as TBDPS which is more stable to Lewis acids. Although magnesium did not lead to deprotection, the IR indicated a low selectivity for ketone complexation.

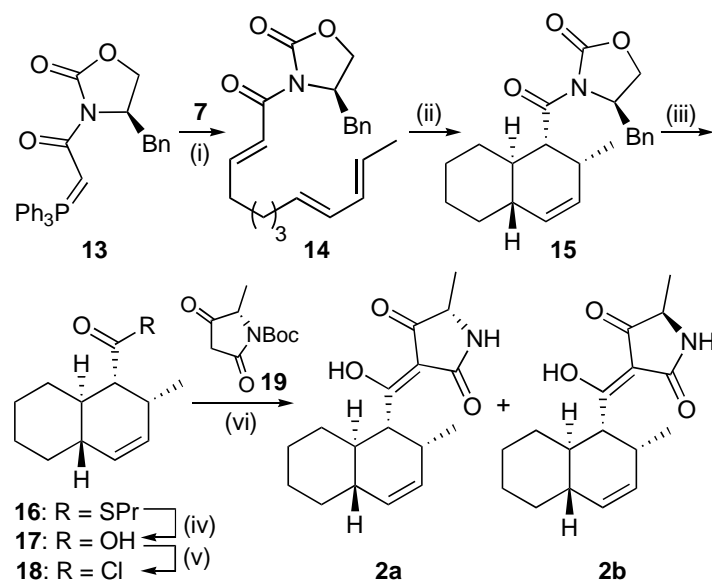
So, the upshot is that we can synthesize one pure stereoisomer of methioisetin **1**, which is very likely not the natural one and which we termed *allo*-methioisetin, by controlling the stereoselectivity of the IMDA reaction in the (*E2,E8,E10*)-dodecatrienoyl residue of **11** via the influence of a rigid enantiopure aluminum chelate complex of its 3-acyltetramic acid core. Aluminum is the only lewis acid tested by us which selectively formed just one stereoisomer. It is also worth mentioning that natural methioisetin **1** could not be obtained by a Jones acylation of **8**, either, due to unwanted deprotection–elimination reactions.

Synthesis of TA-289

Unlike the synthesis of methioisetin, that of TA-289 **2** could be based upon a Jones acylation of the alanine derived tetramic acid **19**²² with the chloride **18** of (1*R*,2*R*,4*aS*,8*aR*)-1,2,4*a*,5,6,7,8,8*a*-octahydro-2-methylnaphthalene-1-carboxylic acid **17**. The acid **17** was synthesized according to the protocol by Paintner¹⁸ using aldehyde **7** which was olefinated with enantiopure amide ylide **13**, readily accessible by reaction of 4-benzyloxazolidin-2-one with ketylenetriphenylphosphorane **9** according to Boeckman *et al.*,²³ to give the IMDA precursor **14** in 57% yield (Scheme 2). The latter was cyclized in the presence of two equivalents of Me₂AlCl at –30 °C to give the decalin derivative **15** with high *endo* diastereoselectivity (*endo:exo* ≥ 50:1) and in 99% yield. Apparently, the only possible aluminum chelate complex of **14** has the trienoyl appendage orientated in a way so as to give exclusively the desired diastereoisomer of **15**. For the cleavage of the Evans' auxiliary the IMDA product **15** was first converted quantitatively to the thioester **16** with a mixture of

propanethiol and *n*-BuLi according to a general protocol by Damon *et al.*²⁴ Since Paintner had reported a partial epimerisation upon basic hydrolysis of the thioester, we now developed an epimerisation-free hydrolysis by means of silver nitrate in aqueous dioxane, in analogy to a protocol by Gerlach,²⁵ which left the acid **17** as a pure enantiomer in 93% yield. Acid **17** was then converted without epimerization to the chloride **18** which was used without further purification to acylate tetramic acid **19** at C-3 in the presence of an excess of borontrifluoride etherate under optimised microwave irradiation conditions.²⁶ However, these still led to partial epimerisation not at C-2 but at C-5' of the tetramic acid and so afforded two inseparable diastereomers which we assigned the structures **2a** and **2b**. **SCHEME 2.**^a

Synthesis of TA-289 **2** via Jones Acylation.



^a Reagents and conditions: (i) toluene, 80 °C, 24 h, 58%; (ii) 2 equiv Me₂AlCl, CH₂Cl₂, –30 °C, 4.5 h, 99%; (iii) propanethiol, *n*-BuLi, THF, 0 °C, 10 min, 99%; (iv) AgNO₃, dioxane/H₂O (4:1), reflux, , 93%; (v) SOCl₂, CH₂Cl₂, rt, 2.5 h, quant; (vi) a) BF₃×Et₂O, microwave (300 W), 60 min, 60 °C, b) MeOH, reflux, 2 h, 35% (**2a** : **2b** = 1.71 : 1).

Interestingly, a synthesis of TA-289 **2** starting from tetramic acid **19**, ylide **9** and aldehyde **7** in analogy to that of *allo*-**1**, also afforded an inseparable mixture (1:1.85) of two major *endo*-diastereoisomers **2a** and **2c** aside from three minor isomers of unassigned configuration. In this case the 5-methyl substituent of the tetramic acid was too small to exert a sufficient stereocontrol over the late stage IMDA reaction, in contrast to the larger TIPSO-ethyl residue

of tetramic acid **11** (Fig. 1).

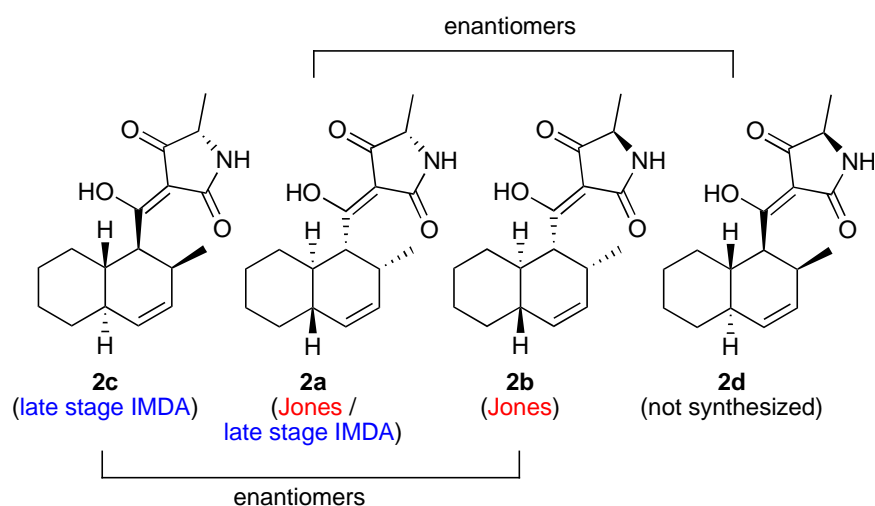


Figure 1. Structures of relevant stereoisomers of TA-289 **2**.

It was not possible to suppress the racemization at C-5' during the Jones acylation by reducing the temperature or irradiation time, which still resulted in mixtures of **2a** and **2b**, albeit in different ratios as to HPLC (*cf* the Supporting Information), or in incomplete conversion. In order to corroborate our assignment of structures **2a** and **2b** and in particular to exclude a conceivable racemization at C-2 of the decalinoyl moiety, we also reacted acid chloride **18** with tetramic acid *ent*-**19** derived from D-alanine under identical Jones conditions (not shown). HPLC analysis revealed the formation of the same products **2a** and **2b**, however with a mirror-inverted ratio when compared to the reaction starting with **18** and **19**. This proves epimerization taking place at C-5' rather than C-2 (*cf* the Supporting Information).

At present, a reliable assignment of the configuration of the isolated natural TA-289, for which no specific optical rotation had been reported, is not possible. A comparison of the ¹H-NMR shifts of natural **2**⁵ and of our synthetic samples obtained by Jones acylation and by late stage IMDA reaction revealed but small differences (Table S4, Supporting Information). The differences in the ¹³C-NMR shifts were more distinct (Table S5, Fig. S2, Supporting Information) with isomer **2b** showing the closest match of the natural isolate when averaged over all carbon atoms. It should be mentioned that any comparison of NMR data of 3-acetyltetramic acids must take into account the intricacy that they may exist as mixtures of

tautomers or rotamers which give rise to different spectra and the ratio of which may change over time. Figure 2 shows the typical example of a mixture of TA-289 diastereoisomers **2a** and **2b** prepared via Jones acylation. The products are formed as BF₂ chelate complexes engaging selectively oxygen atoms 1-O and 2'-O as we know from IR analyses. Upon methanolysis, BF₂ is replaced by a hydrogen bridge, with partial retention of the Z-configuration of the *exo*-enol. The ¹³C-NMR spectrum immediately after HPLC purification showed two signals for C-2' separated by ca. 0.9 ppm, a tall one for the thermodynamically more stable *E*-tautomer and a smaller one for the *Z*-tautomer. There are also two corresponding signals for C-4' of both tautomers, separated by a conspicuous 10.6 ppm and split by 0.1 ppm into doublets of similar height, originating from the two diastereomers. The fact that the signals of C-4' are doubled while those of C-2' are not is explicable by the proximity of C-4' to the stereocenter C-5'. Upon storage and re-dissolution, the same sample of **2a** plus **2b** gave rise to a ¹³C-NMR spectrum showing only the signals of the more stable *E*-tautomers of C-2' and C-4'.

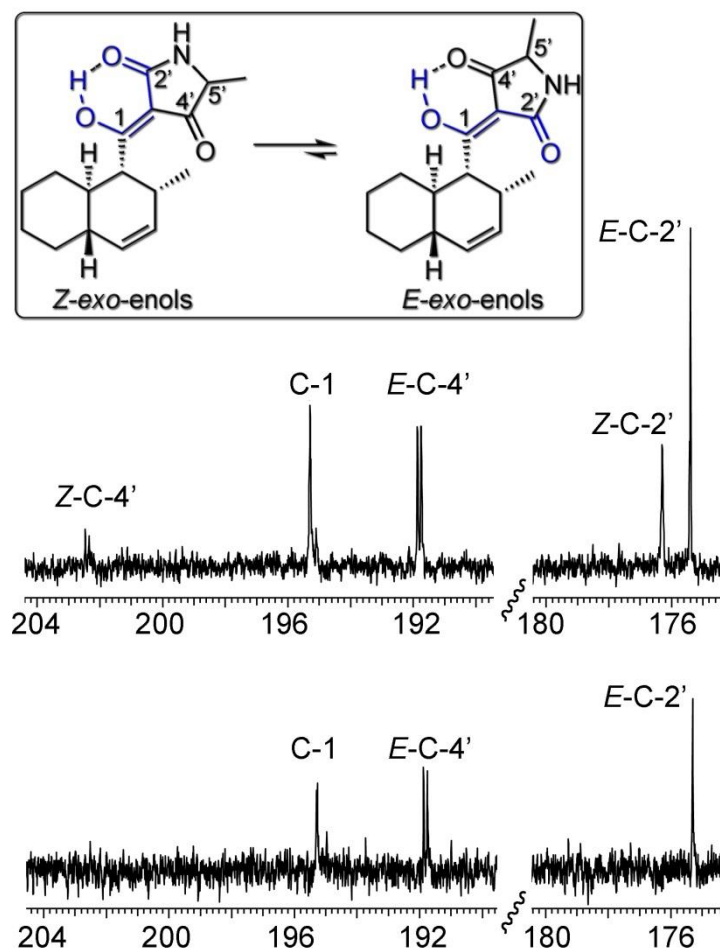


Figure 2. ^{13}C -NMR spectra (carbonyl region, CDCl_3) of a 1:1 mixture of **2a** and **2b** prepared via Jones acylation. Top: immediately after HPLC purification. Bottom: after storage and re-dissolution.

Conclusions

We synthesized a pure diastereoisomer of methiosetin whose decalinoyl moiety is the enantiomer of that of the natural product. This decalin was established by an IMDA reaction of a 3-trienoyltetramic acid, stereocontrolled by a defined (1-O,2'-O)-aluminum chelate complex of the tetramate. This stereoinduction relied both on the rigidity of this complex and on the presence of a bulky residue at C-5', apparent from the failure of a similar stereoinduction in the case of the alanine-derived tetramic acid TA-289. A way to a more general applicability of this stereoinduction strategy might lie in the attachment of cleavable bulky groups at C-5' and in the screening for other precursors of metals such as copper and

lanthanum that form (1-O,4'-O)-chelate complexes. The latter would give access to the opposite diastereoisomers, given they also catalyse the IMDA reaction and do not interfere with protective groups.

Experimental Section

General Remarks. IR spectra were recorded with an FT-IR spectrophotometer equipped with an ATR unit. Chemical shifts of NMR signals are given in parts per million (δ) downfield from tetramethylsilane for ^1H and ^{13}C . Mass spectra were obtained under EI (70 eV) conditions. High resolution mass spectra were obtained with a UPLC/Orbitrap MS system in ESI mode. For chromatography silica gel 60 (230-400 mesh) was used. HPLC was performed on Prontosil RP 200-5-C18, 5 μm , 250 \times 4 mm (analytic) and 250 \times 20 mm (preparative) columns.

3-[(Triphenylphosphoranylidene)acetyl]-(5*S*)-((1'*R*)-1'-triisopropylsilyloxyethyl)-1-methyl-pyrrolidine-2,4-dione **10.** A solution of tetramic acid **8**^{15,16} (570 mg, 1.8 mmol) in THF (24 mL) was treated with Ph_3PCCO **9** (604 mg, 2.0 mmol) and refluxed for 12 h. Evaporation under reduced pressure afforded ylide **10** quantitatively as a brownish foam of m.p. 81 °C. IR (ATR) ν_{max} 2941, 2864, 1656, 1612, 1550, 1463, 1437, 1190, 1103, 1067, 1015, 997, 882, 851, 783, 746, 719, 690, 570, 540 cm^{-1} ; ^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 0.98–1.11 (m, 42 H), 1.39 (d, J = 6.6 Hz, 3 H), 1.44 (d, J = 6.6 Hz, 3 H), 3.019 (s, 3 H), 3.023 (s, 3 H), 3.36 (d, J = 3.0 Hz, 1 H), 3.43 (d, J = 3.0 Hz, 1 H), 4.44 (qd, J = 6.6, 3.0 Hz, 1 H), 4.45 (qd, J = 6.6, 3.0 Hz, 1 H), 5.23 (d, J = 20.3 Hz, 1 H, fast H-D- exchange in CDCl_3 ; signal disappears overnight), 7.45–7.53 (m, 12 H), 7.57–7.68 (m, 18 H); ^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.7 MHz) ylides:betaines ~3:1: δ 14.8/14.9 (P=CHCOH), 21.4/21.9 (P⁺CH₂CO⁻); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz) δ 12.2, 17.75/17.78, 21.8/22.3, 28.58/28.64, 51.2 (d, J = 109.9 Hz)/51.4 (d, J = 111.7 Hz), 67.7/68.3, 69.3/71.3, 91.1/94.9 (d, J = 12.7 Hz), 119.0 (d, J = 88.1 Hz), 124.5/124.7 (d, J = 91.7 Hz), 128.1, 128.2, 128.3, 128.73, 128.76, 128.83, 128.9, 129.3, 129.4, 129.9, 130.0, 131.61, 131.63, 131.7, 132.47, 132.50, 132.55, 132.57, 132.70, 132.79, 132.84, 133.5, 133.6, 134.61, 134.63, 172.5/173.4,

172.3/177.1, 189.7/192.8; HRMS (ESI) m/z : $[M-H]^+$ Calcd for $C_{36}H_{47}NO_4PSi^+$ 616.3007, Found 616.2998.

(5S)-((1R)-Triisopropylsilyloxyethyl)-1-methyl-3-((2E,8E,10E)-dodecatrienoyl)-pyrrolidine-2,4-dione 11. A solution of ylide **10** (920 mg, 1.5 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) was treated with $KOtBu$ (180 mg, 1.6 mmol). After complete dissolution of the base, decadienal **7** (210 mg, 1.38 mmol) was added, the mixture was stirred over night at room temperature, and finally washed with 1M aqueous $NaHSO_4$, dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by reversed phase column chromatography (C-18, rinsing with 85% MeOH, 0.1% HCOOH in the water fraction, elution of the product with pure MeOH) to afford **11** as a yellow oil (550 mg, 1.1 mmol, 81%). IR (ATR) ν_{max} 2938, 2866, 1709, 1645, 1583, 1461, 1375, 1327, 1215, 1139, 1097, 1068, 986, 910, 882, 828, 782, 731, 677 cm^{-1} ; 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 0.75–1.10 (m, 21 H), 1.33–1.50 (m, 4H), 1.40 (d, J = 6.6 Hz, 3 H), 1.69 (d, J = 6.3 Hz, 3 H), 1.98–2.10 (m, 2 H), 2.21–2.35 (m, 2 H), 3.09 (s, 3 H), 3.47 (d, J = 1.4 Hz, 1 H), 4.52 (qd, J = 6.6, 1.4 Hz, 1 H), 5.32–5.63 (m, 2 H), 5.84–6.06 (m, 2 H), 6.98–7.17 (m, 2 H); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz) δ 12.5, 17.9, 18.0, 22.6, 27.7, 28.9, 29.1, 32.2, 32.9, 68.2, 72.3, 100.2, 121.6, 126.8/130.6/131.2/131.5, 149.4, 172.5, 174.4, 193.3; HRMS (ESI) m/z : $[M+H]^+$ Calcd for $C_{28}H_{48}NO_4Si^+$ 490.3347, Found 490.3348; $[M+H]^+$ Calcd for $C_{28}H_{48}NaNO_4Si^+$ 512.3166, Found 512.3168; $[M-H]^-$ Calcd for $C_{28}H_{46}NO_4Si^-$ 488.3202, Found 488.3212.

(1R,2R,4aS,8aR)-1,2,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-2-methylnaphthalene-1-carbonyl chloride 18. Under exclusion of air and moisture, a solution of acid **17** (117 mg, 0.6 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) was treated with $SOCl_2$ (435 μ L, 714 mg, 6 mmol). The resulting mixture was stirred for 2.5 h at room temperature, all volatiles were removed *in vacuo*, and the crude product was used without further purification. IR (ATR) ν_{max} 2924, 2854, 1800, 1448, 1376, 1279, 1252, 1208, 1146, 1089, 993, 953, 938, 914, 892, 852, 818, 796, 773, 734, 708, 635 cm^{-1} ; 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 0.93 (dq, J = 11.5, 4.4 Hz, 1 H), 1.00 (d, J = 6.9 Hz, 3 H), 1.03–1.07 (m, 1 H), 1.09 (d, J = 4.1 Hz, 1 H), 1.28–1.38 (m, 3 H), 1.46 (qd, J = 11.3, 2.5 Hz, 2 H), 1.70–1.80 (m, 4 H), 2.04 (d, J = 12.3 Hz, 2 H), 2.86 (qd, J = 5.8, 1.4 Hz, 4 H), 3.09 (dd, J = 11.4, 5.9 Hz, 1 H), 5.40 (d, J = 10.0 Hz, 4 H), 5.58 (ddd, J = 10.0, 4.4,

2.5 Hz, 4 H); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 126 MHz) δ 17.6, 26.5, 26.6, 30.0, 32.1, 33.0, 36.3, 42.0, 49.2, 130.5, 131.0, 179.2.

(5S)-((1'R)-hydroxyethyl)-1-methyl-3-((1R,2R,4aS,8aR)-1,2,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-2-methylnaphthalene-1-carbonyl)pyrrolidine-2,4-dione (*allo*-methiosetin; *allo*-1). A solution of 3-dodecatrienoyltetramic acid **11** (200 mg, 0.4 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) was treated dropwise with a 1M solution of Me_2AlCl in hexane (2 equiv., 0.8 mL) and then stirred for 3d. The mixture was washed with 1M aqueous NaHSO_4 , dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in CH_2Cl_2 (10 mL) at room temperature and treated with $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ (0.8 mmol, 211 μL , 48% in Ether) under exclusion of air and moisture. After stirring overnight, the solution was washed with 1M aqueous NaHSO_4 , dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude BF_2 - complex was hydrolyzed by boiling in methanol for 2 h. The solvent was evaporated, and the residue was taken up in ethyl acetate and washed with water. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and evaporated. The free 3-acyltetramic acid was purified by preparative HPLC (Kinetex C-18, 5 μm , rinsing with 65% MeOH, 0.1% HCO_2H in the water fraction, elution of the product with 77% MeOH) to afford *allo*-**1** as a yellow oil (38 mg, 0.11 mmol, 29%); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -107 (c 0.824, MeOH). IR (ATR) ν_{max} 3438 (br), 3010, 2968, 2925, 2854, 1705, 1644, 1606, 1485, 1449, 1394, 1374, 1333, 1281, 1257, 1212, 1124, 1088, 989, 946, 732 cm^{-1} ; ^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 0.88-0.92 (m, 1 H), 0.96 (d, J = 7.0 Hz, 3 H), 1.14 (d, J = 6.7 Hz, 2 H), 1.27–1.40 (m, 2 H), 1.59 (dddd, J = 11.7, 11.3, 10.0, 2.8 Hz, 1 H), 1.66–1.77 (m, 4 H), 1.78–1.88 (m, 2 H), 2.47–2.58 (m, 1 H), 2.99 (s, 3 H), 3.70 (dd, J = 11.6, 5.8 Hz, 1 H), 3.80 (d, J = 4.6 Hz, 1 H), 4.18 (qd, J = 6.7, 4.6 Hz, 1 H), 5.41 (d, J = 9.9 Hz, 1 H), 5.55 (ddd, J = 9.9, 4.4, 2.7 Hz, 1 H); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 126 MHz) δ 17.6, 17.8, 26.5, 26.6, 27.1, 29.9, 33.0, 33.2, 36.0, 42.2, 46.6, 66.7, 68.5, 102.7, 130.8, 130.9, 174.1, 191.1, 194.8; ^1H -NMR (MeOD, 500 MHz) δ 0.88 (dq, J = 12.2, 2.5 Hz, 1 H), 0.92 (d, J = 7.0 Hz, 1 H), 1.05–1.14 (m, 1 H), 1.31 (d, J = 6.7 Hz, 3 H), 1.56 (qd, J = 11.3, 2.5 Hz, 1 H), 1.74–1.78 (m, 2 H), 1.85 (d, J = 11.6 Hz, 1 H), 2.53 (td, J = 6.1, 5.2 Hz, 1 H), 3.06 (s, 2 H), 3.71 (br., s, 1 H), 3.77 (dd, J = 11.5, 5.5 Hz, 1 H), 4.16 (qd, J = 6.7, 3.4 Hz, 1 H), 5.41 (d, J = 9.8 Hz, 1 H), 5.56 (ddd, J = 10.1, 4.6, 2.5 Hz, 1 H); HRMS (ESI) m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{NO}_4^-$ 332.1856, Found 332.1871.

(5*R/S*)-Methyl-3-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aR*)-1,2,4*a*,5,6,7,8,8*a*-octahydro-2-methylnaphthalene-1-carbonyl)pyrrolidine-2,4-dione (TA-289; **2a + **2b**).** *N*-Boc-5-methyltetramic acid **19**²² (128 mg, 0.6 mmol), acid chloride **18** (128 mg, 0.6 mmol), and BF₃·OEt₂ (48% in diethyl ether, 4 mL) were placed in a glass vial which was sealed and placed inside a CEM Discover single-mode microwave synthesizer where it was exposed to microwaves (300 W) at 60 °C for 1 h. The cap was removed and the mixture was partitioned between ethyl acetate and sat. aqueous NH₄Cl. The phases were separated, the water layer was extracted with ethyl acetate and the combined organic phases were evaporated under reduced pressure. The crude BF₂-complex was hydrolyzed by boiling in MeOH for 2 h. The solvent was evaporated, the residue taken up in ethyl acetate and washed with water. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The free 3-acyltetramic acid was purified by preparative HPLC (Kinetex C-18, ramp: within 3 min from 65% to 70% MeOH, 0.1% HCOOH in the water fraction, *t_R* analyt: 34.7 min) to afford **2** (60 mg, 0.21 mmol, 35%) as a yellow oil. IR (ATR) ν_{max} 3241 (br), 2962, 2923, 2851, 1655, 1688, 1599, 1446, 1373, 1335, 1280, 1261, 1232, 1089, 1023, 967, 908, 803, 731 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 0.85–0.92 (m, 1 H), 0.95 (d, *J* = 7.3 Hz, 3 H), 1.37 (d, *J* = 6.7 Hz, 3 H), 1.46 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 1.59 (qd, *J* = 11.0, 2.7 Hz, 1 H), 1.70–1.78 (m, 8 H), 1.78–1.88 (m, 4 H), 2.54–2.61 (m, 1 H), 3.73 (dd, *J* = 11.4, 5.7 Hz, 1 H), 3.84–3.95 (m, 1 H), 5.40 (d, *J* = 9.8 Hz, 1 H), 5.55 (ddd, *J* = 9.9, 4.3, 2.5 Hz, 1 H) 6.18 (br., s., 1 H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 17.5, 17.8, 26.5, 26.6, 30.0, 33.1, 33.2, 35.9, 42.2, 46.5, 57.7, 101.2, 130.8, 131.1, 175.3, 192.0, 195.2; HRMS (ESI) *m/z*: [M-H]⁻ Calcd for C₁₇H₂₂NO₃⁻ 288.1594, Found 288.1607.

Supporting Information Available: ¹H and ¹³C-NMR spectra of *allo*-**1**, **2a+2b**, **6**, **7**, **10**, **11**, **14–18**; comparison of chemical ¹H and ¹³C shifts of natural **2** and various synthetic stereoisomers of **2**; HPLC chromatograms of epimers of **2**. This material is free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

- (1) Royles, B. J. L. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1981-2001.
- (2) Schobert, R.; Schlenk, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4203-4221.
- (3) Mo, X.; Li, Q.; Ju, J. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 50566-50593.
- (4) Herath, K.; Jayasuriya, H.; Zink, D. L.; Sigmund, J.; Vicente, F.; de la Cruz, M.; Basilio, A.; Bills, G. F.; Polishook, J. D.; Donald, R.; Phillips, J.; Goetz, M.; Singh, S. B. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 420-424.
- (5) Quek, N. C. H.; Matthews, J. H.; Bloor, S. J.; Jones, D. A.; Bircham, P. W.; Heathcott, R. W.; Atkinson, P. H. *Mol. Biosyst.* **2013**, *9*, 2125-2133.
- (6) Kong, L.; Rao, M.; Ou, J.; Yin, J.; Lu, W.; Liu, M.; Pang, X.; Gao, S. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 7591-7597.
- (7) Burke, L. T.; Dixon, D. J.; Ley, S. V.; Rodríguez, F. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3611-3613.
- (8) Burke, L. T.; Dixon, D. J.; Ley, S. V.; Rodríguez, F. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 274-280.
- (9) Kauh, U.; Andernach, L.; Weck, S.; Sandjo, L. P.; Jacob, S.; Thines, E.; Opatz, T. *J. Org. Chem.* **2015**, *81*, 215-228.
- (10) Healy, A. R.; Westwood, N. J. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10527-10531.
- (11) Hori, K.; Arai, M.; Nomura, K.; Yoshii, E. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 4368-4371.
- (12) Sengoku, T.; Wierzejska, J.; Takahashi, M.; Yoda, H. *Synlett* **2010**, 2944-2946.
- (13) Jones, R. C. F.; Begley, M. J.; Peterson, G. E.; Sumaria, S. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 1959-1968.
- (14) (a) Schlenk, A.; Diestel, R.; Sasse, F.; Schobert, R. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2599-2604. (b) Bruckner, S.; Bilitewski, U.; Schobert, R. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 1136-1139.
- (15) Kempf, K.; Raja, A.; Sasse, F.; Schobert, R. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 2455-2461.
- (16) Kempf, K.; Schmitt, F.; Bilitewski, U.; Schobert, R. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 5064-5068.
- (17) Schobert, R.; Siegfried, S.; Nieuwenhuyzen, M.; Milius, W.; Hampel, F. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 1723-1730.
- (18) Paintner, F. F.; Bauschke, G.; Polborn, K. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2549-2552.
- (19) Zaghouani, M.; Nay, B. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, DOI: 10.1039/C5NP00144G.
- (20) Biersack, B.; Diestel, R.; Jagusch, C.; Sasse, F.; Schobert, R. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 72-76.
- (21) Lebrun, M.-H.; Duvert, P.; Gaudemer, F.; Gaudemer, A.; Deballon, C.; Boucly, P. *J. Inorg. Biochem.* **1985**, *24*, 167-181.
- (22) Tanaka, A.; Usuki, T. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 5036-5038.
- (23) Boeckman, R. K., Jr.; Song, X.; Pero, J. E. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8969-8972.
- (24) Damon, R. E.; Coppola, G. M. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2849-2852.
- (25) Shenvi, A. B.; Gerlach, H. *Helv. Chim. Acta* **1980**, *61*, 2426-2433.
- (26) Schobert, R.; Jagusch, C. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2301-2307.

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 5 Nr. 4 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach den gesetzlichen Bestimmungen über die Führung akademischer Grade zur Führung eines Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.

(§ 8 S. 2 Nr. 5 PromO)

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

(§ 8 S. 2 Nr. 7 PromO)

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

(§ 8 S. 2 Nr. 8 PromO)

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

(§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

.....
Ort, Datum, Unterschrift